

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock

Direktor : Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt

***In-vitro*-Untersuchungen zum Vergleich der Wirkung hoch und niedrig dosierter Bestrahlung anhand von Endothelzellen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

2014

vorgelegt von

Steffen Reichert

aus Tübingen

geboren am 08.01.1985 in Tübingen

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. Christian Junghanß
Klinik für Hämatologie und Onkologie
Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Franz Rödel
Klinik für Strahlentherapie und Onkologie
Universitätsklinikum Frankfurt

Datum der Einreichung: 24.01.2014

Datum der Verteidigung: 25.11.2014

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI

1 Einleitung

1.1 Radiotherapie benigner Erkrankungen.....	1
1.2 Physikalische Grundlagen	2
1.3 Entzündung.....	3
1.4 Immunmodulatorische Wirkung der LD-RT.....	5
1.5 Zielstellung.....	8

2 Material und Methoden

2.1 Endothelzellen	9
2.1.1 Ausfrieren der Zellen.....	10
2.1.2 Kultivierung der Zellen.....	10
2.1.3 Bestimmung der Zellzahl.....	10
2.2 TNF- α	11
2.3 Wachstumskurven	11
2.4 Zellbestrahlung	11
2.4.1 Bestrahlung für die Versuche zur Messung der metabolischen Aktivität und des klonogenen Überlebens	12
2.4.2 Bestrahlung für die Versuche zur Messung der TGF- β_1 -Sekretion.....	15
2.5 Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels EZ4U-Test	16
2.5.1 Bestimmung der optimalen Einsaatdichte und Inkubationszeit.....	16
2.5.2 Bestimmung der metabolischen Aktivität für die weiteren Experimente.....	16
2.6 Bestimmung des klonogenen Überlebens mittels Koloniebildungstests	17
2.6.1 Bestimmung der optimalen Einsaatdichte der Koloniebildungstests	17
2.6.2 Bestimmung des klonogenen Überlebens für die weiteren Experimente.....	18
2.7 Bestimmung der TGF- β_1 -Freisetzung mittels Immunoassay	18

2.8 Statistische Analyse	19
2.9 Materialien und Geräte	19
3 Ergebnisse	
3.1 Wachstumskurven	21
3.1.1 Native Wachstumskurven mit Serum	21
3.1.2 Wachstumskurven unter Entzug des Serums im Medium	22
3.2 Metabolische Aktivität der H5V-Zellen	24
3.2.1 Vorversuch zur Einsaatdichtebestimmung	24
3.2.2 Metabolische Aktivität nach einmaliger Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät	26
3.2.3 Metabolische Aktivität nach fraktionierter Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät	33
3.2.4 Metabolische Aktivität nach Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger	36
3.3 Klonogenes Überleben	42
3.4 Bestimmung der TGF- β_1 -Konzentration	48
4 Diskussion	
4.1 Wachstumskurven	53
4.2 Metabolische Aktivität	54
4.2.1 Bestrahlung mit Einzeldosen am Röntgentherapiegerät	55
4.2.2 Fraktionierte Bestrahlung am Röntgentherapiegerät	56
4.2.3 Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger	58
4.3 Koloniebildungstests	60
4.4 Bestimmung der TGF- β_1 -Sekretion	63
4.5 Stimulation mit TNF- α	66
5 Zusammenfassung	67
Literaturverzeichnis	69

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Darstellung unterschiedlicher antiinflammatorischer Wirkungsmechanismen von LD-RT.....	7
Abb. 2:	Mikroskopische Darstellung der H5V-Zellen (400x)	9
Abb. 3:	Mikroskopische Darstellung der H5V-Zellen (100x)	9
Abb. 4:	Bestrahlungsschema für die vierfach fraktionierte Bestrahlung.....	13
Abb. 5:	Muster für die Einsaat der Zellen in eine 96-Wellplatte für die Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät (RT 200).....	14
Abb. 6:	Muster für die Einsaat der Zellen in eine 96-Wellplatte für die Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger.....	14
Abb. 7:	Muster für die Einsaat der Zellen in eine 6-Wellplatte für die Durchführung von Koloniebildungstests.....	15
Abb. 8:	Muster für die Einsaat der Zellen in eine 96-Wellplatte für die Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät (X-Strahl).....	15
Abb. 9:	Native Wachstumskurven der H5V-Zellen bei unterschiedlichen Einsaatdichten.....	22
Abb. 10:	Native Wachstumskurven der H5V-Zellen mit und ohne Entzug des Serums am dritten Zähltag.....	23
Abb. 11:	Veränderung der optischen Dichten im zeitlichen Verlauf bei Durchführung des EZ4U-Tests 1 h nach Bestrahlung.....	24
Abb. 12:	Veränderung der optischen Dichten im zeitlichen Verlauf bei Durchführung des EZ4U-Tests 24 h nach Bestrahlung.....	25
Abb. 13:	Metabolische Aktivität der H5V-Zellen 1 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät.....	27
Abb. 14:	Metabolische Aktivität der H5V-Zellen 24 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät.....	28
Abb. 15:	Metabolische Aktivität der H5V-Zellen 1 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät und um den Faktor 5 erhöhter Konzentration von TNF- α	29
Abb. 16:	Metabolische Aktivität der H5V-Zellen 24 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät und um den Faktor 5 erhöhter Konzentration von TNF- α	30
Abb. 17:	Metabolische Aktivität der ohne Serum inkubierten H5V-Zellen 1 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät.....	31

Abb. 18: Metabolische Aktivität der ohne Serum inkubierten H5V-Zellen 24 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät.....	32
Abb. 19: Metabolische Aktivität der serumfrei inkubierten H5V-Zellen 1 h nach fraktionierter Bestrahlung (4 x) mit dem Röntgentherapiegerät.....	33
Abb. 20: Metabolische Aktivität der serumfrei inkubierten H5V-Zellen 24 h nach fraktionierter Bestrahlung (4 x) mit dem Röntgentherapiegerät.....	34
Abb. 21: Metabolische Aktivität der H5V-Zellen 1 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger.....	36
Abb. 22: Metabolische Aktivität der H5V-Zellen 24 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger.....	37
Abb. 23: Metabolische Aktivität der ohne Serum inkubierten H5V-Zellen 1 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger.....	38
Abb. 24: Metabolische Aktivität der ohne Serum inkubierten H5V-Zellen 24 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger.....	39
Abb. 25: Metabolische Aktivität der ohne Serum inkubierten H5V-Zellen 1 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger.....	40
Abb. 26: Metabolische Aktivität der ohne Serum inkubierten H5V-Zellen 24 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger.....	41
Abb. 27: Koloniezahl der H5V-Zellen bei unterschiedlichen Einsaatdichten.....	42
Abb. 28: Plattiereffizienz der in serumhaltigen Medium inkubierten H5V-Zellen.....	43
Abb. 29: Plattiereffizienz der temporär ohne Serum kultivierten H5V-Zellen nach Bestrahlung.....	44
Abb. 30: Plattiereffizienz der temporär ohne Serum kultivierten H5V-Zellen nach fraktionierter (4 X) Bestrahlung.....	45
Abb. 31: Koloniebildungsfähigkeit der temporär ohne Serum inkubierten H5V-Zellen nach Bestrahlung mit Einzeldosen am Röntgentherapiegerät.....	46
Abb. 32: Koloniebildungsfähigkeit der temporär ohne Serum inkubierten H5V-Zellen nach fraktionierter Bestrahlung am Röntgentherapiegerät.....	47
Abb. 33: Koloniebildungsfähigkeit der temporär ohne Serum inkubierten H5V-Zellen nach Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger.....	48
Abb. 34: Relative TGF- β_1 -Konzentration im Überstand der H5V-Zellen 4 h nach Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät.....	49

Abb. 35: Relative TGF- β_1 -Konzentration im Überstand der H5V-Zellen 24 h nach Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät.....	50
Abb. 36: Relative TGF- β_1 -Konzentration im Überstand der H5V-Zellen 4 h nach Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger.....	51
Abb. 37: Relative TGF- β_1 -Konzentration im Überstand der H5V-Zellen 24 h nach Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger.....	52

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Muster für die Dosen der Bestrahlung der H5V-Zellen in 6- bzw. 96 Wellplatten.....	12
---	----

Abkürzungsverzeichnis

ALK1	Activin receptor-like kinase 1
ALK5	Activin receptor-like kinase 5
CCL-20	Chemokine (C-C motif) ligand 20
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinases
et al.	und andere
FADD	Fas-associated death domain
FBS	Fetal Bovine Serum
Fx	Fraktion
Gy	Gray
HCl	Hydrogenchlorid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HUVEC	Humane Endothelzellen der Umbilikalvene (human umbilical vascular endothelial cell)
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IL-1	Interleukin 1
IL1R1	Interleukin-1-Rezeptor Typ 1
IL-6	Interleukin 6
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IRSL	Irradiation-induced senescence-like
J	Joule

LD-RT	Low-dose radiotherapy
LET	Linearer Energietransfer
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MEK	Mitogen-activated Protein Kinase Kinase
MW	Mittelwert
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate buffered Saline
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
RIP1	Receptor-Interacting Protein 1
RTG	Röntgentherapiegerät
ROS	Reactive oxygen species
SD	Standardabweichung
TGF- β_1	Transforming growth factor β_1
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TNFR2	Tumor necrosis factor receptor 2
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRADD	TNFR-associated death domain
VCAM-19	Vascular cell adhesion molecule 19
VEGF2	Vascular Endothelial Growth Factor 2
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

1 Einleitung

1.1 Radiotherapie benigner Erkrankungen

Neben der Behandlung maligner Erkrankungen spielt die Strahlentherapie auch bei der Therapie benigner Erkrankungen eine wichtige Rolle. Die erste Bestrahlung geht auf den Dermatologen Leopold Freund zurück, der 1896 bei einem 5-jährigen Mädchen einen Tierzellnävus bestrahlte (SEEGENSCHMIEDT & MICKE, 2012). Während die Bestrahlung zur Behandlung von Tumorerkrankungen noch eine untergeordnete Rolle spielte, wurden die Indikationen zur Bestrahlung auf zahlreiche benigne Erkrankungen wie z.B. Tonsillitis und Tuberkulose ausgedehnt (SEEGENSCHMIEDT & MICKE, 2012). Bis in die 50er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde die niedrig dosierte Strahlentherapie (low dose radiotherapy, LD-RT) benigner Erkrankungen weitgehend unkritisch eingesetzt. Erst die Nachweise höherer Inzidenzen von Leukämien bei Opfern des Atombombenabwurfs über Nagasaki (TOMONAGA, 1962) sowie bei bestrahlten Patienten (COURT-BROWN & DOLL, 1965) führten zu einer kritischen Hinterfragung der Strahlenbehandlung bei benignen Erkrankungen. Insbesondere die angloamerikanischen Länder lehnten die Bestrahlung zunehmend ab.

In den letzten Jahrzehnten konnte jedoch in zahlreichen Studien in Deutschland und Europa die Wirksamkeit der Strahlentherapie im niedrig dosierten Bereich (Einzeldosen ≤ 1 Gy) belegt werden. Beispielsweise wurde in einer randomisierten placebokontrollierten Studie der Arbeitsgruppe „Gutartige Erkrankungen bei schmerzhaftem Fersensporn“ eine Wirksamkeit der LD-RT nachgewiesen (NIEWALD et al., 2012). Auch zeigen neuere Studien, dass für die oft angewandte effektive Dosis das zusätzliche Krebsrisiko eher überschätzt wird. Bei Bestrahlung der Extremitäten, bei der außer der Haut kein strahlenkritisches Organ im Bestrahlungsfeld liegt, ist das Risiko der Malignomentstehung mit demjenigen von diagnostischen Röntgenuntersuchungen vergleichbar (TROTT & KAMPRAD, 2006). Heute sind degenerative Erkrankungen wie Periarthritis humeroscapularis, Epicondylopathia humeri, aktivierte Arthrose und Fersensporn die häufigsten Indikationen zur niedrig dosierten Strahlentherapie. Weitere Indikationen sind funktionelle, hyperplastische und entzündliche Erkrankungen (SEEGENSCHMIEDT et al., 2004; SEEGENSCHMIEDT & MICKE, 2012).

Auch die radiobiologische Grundlagenforschung machte in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte. Molekulare Mechanismen der antiinflammatorischen Wirkung von LD-RT konnten in Teilen aufgeklärt werden (Vgl. Kapitel 1.4 Antiinflammatorische Wirkung der LD-RT). Gleichzeitig kam es in den letzten Jahren zu einem deutlichen Anstieg der Fallzahlen für die LD-RT, vor allem bei schmerzhaften degenerativen Erkrankungen, welcher die zunehmende Bedeutung der LD-RT dokumentiert (SEEGENSCHMIEDT & MICKE, 2012).

1.2 Physikalische Grundlagen

Strahlung kann als bewegte Energie aufgefasst werden. Sie kann in Teilchenstrahlung (Alpha- und Betastrahlung) sowie in Wellenstrahlung (Photonenstrahlung) wie beispielsweise Gamma- und Röntgenstrahlung unterteilt werden. Die Energiedosis ist der Quotient aus der absorbierten Energie in Joule (J) in einem bestimmten Volumen und dessen Masse in Kilogramm (kg). Sie wird in Grey (Gy) angegeben. Dabei werden bei der Bestrahlung entzündlicher Erkrankungen in der Regel Einzeldosen unter 1 Gy und Gesamtdosen unter 10 Gy verwendet. Besitzt die Strahlung eine Energie, die hoch genug ist ein Elektron aus der Schale eines Atoms loszulösen, handelt es sich um ionisierende Strahlung. Dabei sind geladene Teilchen wie Alphateilchen, Elektronen und Protonen in der Lage die Atome entlang ihres Weges direkt zu ionisieren. Dagegen werden bei der indirekt ionisierenden Strahlung in einem Zwischenschritt geladene Sekundärteilchen freigesetzt, welche wiederum benachbarte Atome ionisieren können. Für Röntgen- bzw. γ -Strahlung sind dies Elektronen und die durch Kaskaden weiterer Stoßprozesse generierten Sekundärelektronen. Dies führt in biologischen Systemen vor allem zur Wasserradiolyse und zur Bildung von Radikalen, die in weiteren Prozessen zu Veränderung von Molekülbindungen in Makromolekülen, wie der DNA, führen. Zur Charakterisierung der Strahlenqualität dient der lineare Energietransfer (LET). Er beschreibt die pro Wegstrecke der geladenen Teilchen im Mittel abgegebene Energie (WEBER & WENZ, 2006). Da gleiche Bestrahlungsdosen unterschiedliche biologische Wirkungen erzeugen können, müssen die applizierten Dosen noch mit entsprechenden Wichtungsfaktoren modifiziert werden, um eine effektive Äquivalentdosis zu erhalten, welche der biologischen Strahlenwirkung entspricht. Diese Wichtungsfaktoren schließen sowohl die Strahlenart als auch die bestrahlten Organe oder Gewebe ein. In der Tumorthherapie gilt die DNA als wichtigster Angriffspunkt der Strahlenwirkung. Die Wirkung findet sowohl indirekt hauptsächlich über die Bildung von reaktiven Wasserradikalen als auch über direkte DNA-Schädigung statt. Beispiele solcher Schäden sind Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie Quervernetzungen innerhalb der DNA oder mit Proteinen

(SAUER et al., 2010). Diese Schädigungen können zur dauerhaften Inaktivierung der Teilungsfähigkeit einzelner Zellen in Geweben oder *In-vitro*-Kulturen führen und gelten als funktionale Definition des Zelltodes (WEBER & WENZ, 2006). Bei der Bestrahlung entzündlicher Erkrankungen werden in der Regel niedrigere Dosen verwendet, die sich auf das Überleben von Zellen allenfalls minimal auswirken und die in zahlreichen Studien beobachteten antiinflammatorische Wirkung der LD-RT nicht ausreichend erklären können. Die für diese Wirkung in Frage kommenden Mechanismen sind in Kapitel 1.4 näher beschrieben.

1.3 Entzündung

Entzündungen entstehen aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Zellen und Botenstoffe als Reaktion auf eine Noxe bzw. potentielle Schädigung des Organismus. Im Wesentlichen kann der Verlauf einer Entzündung in akut und chronisch unterteilt werden. Klassische klinische Zeichen der akuten Entzündung sind Rötung (rubor), Schwellung (tumor), Schmerz (dolor), Überwärmung (calor) sowie eingeschränkte Funktion des betroffenen Organs (functio laesa). Die chronische Entzündung kann entweder primär chronisch auftreten oder sich sekundär aus einer akuten Entzündung entwickeln. Kennzeichnend für die chronische Entzündung ist der protrahierte Verlauf von Wochen bis Jahren; nicht selten kommt es dabei zu einer Fibrosierung des betroffenen Organs. Bei der akuten Entzündung kommt es nach einer kurzen Phase (ca. 30 min) der Vasokonstriktion zu einer Mediator vermittelten Vasodilatation. Mögliche Mediatoren sind Leukotriene sowie unterschiedliche Zytokine, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1; HERBST et al., 2008).

TNF- α ist ein starker Aktivator von Endothelzellen sowie ein Induktor von lokalen Entzündungsreaktionen, der dazu beiträgt Infektionen einzudämmen. Bei Auftreten von systemischen Infektionen kommt es zur Freisetzung von TNF- α durch Makrophagen in Leber, Milz und anderen Körperbereichen. Diese systemische Freisetzung verursacht eine Gefäßerweiterung, die zu einer Erniedrigung des Blutdruckes und zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität führen kann. TNF- α kann auch beim septischen Schock innerhalb der Blutgefäße eine Blutgerinnung auslösen, die zur Bildung winziger Thromben und konsekutiver Verbrauchskoagulopathie führen kann (JANEWAY et al., 2008). Entscheidend für die zelluläre Immunreaktion ist die Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen. Durch die Vasodilatation und Stase wandern die Leukozyten aus dem Zentralstrom zur Peripherie, die Adhäsionsmoleküle der Leukozyten und Endothelzellen können vermehrt interagieren. Wichtige Adhäsionsmoleküle sind die Selektine, die sowohl von den

Endothelzellen (P-Selektin, E-Selektin) als auch von den Leukozyten (L-Selektin) exprimiert werden können (HERBST et al., 2008). TNF- α und IL-1 können die Expression von Selektinen und weiteren Adhäsionsmolekülen an den Endothelzellen induzieren. Die unterschiedlichen Adhäsionsmoleküle führen zunächst zu einem Vorgang, der als Rollen bezeichnet wird. Dabei kommt es zu vorübergehenden schwachen Bindungen zwischen Endothelzellen und Leukozyten, die sich immer wieder lösen. Dies führt zu einer Abnahme der Fließgeschwindigkeit der Leukozyten mit der Möglichkeit stabilere Bindungen mit den Endothelzellen einzugehen. Diese stabileren Bindungen werden durch Integrine an der Leukozytenoberfläche und deren Liganden an den Endothelzellen (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1; vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) vermittelt (SCHMIDT et al., 2012). Neben ihrer Funktion bei der Rekrutierung von Leukozyten haben die Endothelzellen auch in anderen Situationen des entzündlichen Geschehens wichtige Funktionen. Ihre Reaktion kann in zwei Typen unterteilt werden. Eine schnelle, typischerweise G-Protein gekoppelte Reaktion, die zur Aktivierung der Cyclooxygenase-1 führt und eine langsamere Reaktion, die typischerweise durch Bindung von TNF- α an den TNFR1-Rezeptor (tumor necrosis factor receptor 1) und IL-1 an dessen Typ 1 Rezeptor (Interleukin-1-Rezeptor Typ 1, IL1R1) ausgelöst wird und letztendlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt (POBER & COTRAN, 1990; POBER et al. 2007). Dieser wiederum führt zur Synthese von über 200 Genprodukten, wie zum Beispiel proinflammatorischer Zytokine, Wachstumsfaktoren, Chemokinen und zur Aktivierung verschiedener „Zellüberlebensgene“ (CHU, 2013). Darüber hinaus kann TNF- α über die death domain des TNFR1 zur Apoptose in den betroffenen Zellen führen. Dieser Effekt wird jedoch *in vivo* durch die gleichzeitige Aktivierung von NF- κ B unterdrückt (WAJANT et al., 2003). Während der ubiquitär vorkommende TNFR1-Rezeptor sowohl durch die lösliche als auch durch die membrangebundene Form von TNF- α aktiviert werden kann, wird der hauptsächlich auf Lymphozyten und Endothelzellen vorkommende TNFR2 ausschließlich von der membrangebundenen Form von TNF- α aktiviert (CHU, 2013). TNF- α kann über den Rezeptor Typ 2 (TNFR2) zu einer Transaktivierung von Vascular endothelial growth factor 2 (VEGF2) und zu einer gesteigerten Angiogenese führen (ZHANG et al., 2003). Darüber hinaus können aber auch die proapoptotischen Effekte durch den TNFR1 verstärkt werden (GRELL et al., 1999).

1.4 Immunmodulatorische Wirkung der LD-RT

Die Wirkung hoch dosierter Bestrahlung in Bezug auf das Immunsystem ist gut untersucht und zeigt neben lokalen entzündungsfördernden Eigenschaften (WILLIAMS et al., 2003) auch immunsuppressive Wirkungen. Dies gilt insbesondere für die Ganzkörperbestrahlung. Ursachen hierfür sind beispielsweise die Hemmung der Antigenpräsentation (ANTON et al., 1998) oder die chromosomale Schädigung von Immunzellen (KUSUNOKI et al., 1995; AWA et al. 1978).

Dagegen ist die Wirkung der niedrig dosierten Bestrahlung noch zu großen Teilen unklar. Dennoch konnten in den letzten Jahren einige immunmodulatorische Eigenschaften der LD-RT, die sich teilweise von der Wirkung der hoch dosierten Bestrahlung unterscheiden, aufgeklärt werden (SEEGENSCHMIEDT et al., 2012; RÖDEL et al., 2012a; RÖDEL et al., 2012b; MANDA et al., 2012). Während bei der hoch dosierten Bestrahlung im Rahmen der Tumorthherapie bei der Immunsuppression die Hemmung von Zellproliferation durch dauerhafte Inaktivierung der Teilungsfähigkeit der bedeutsamste biologische Effekt ist, spielen bei der antiinflammatorischen Wirkung der niedrig dosierten Bestrahlung andere Mechanismen eine Rolle (WEBER & WENZ, 2006). Die Modulierung unterschiedlicher zellulärer Komponenten wie Endothelzellen, Granulozyten, mononukleärer Zellen und Makrophagen scheint eine Rolle zu spielen (RÖDEL et al., 2007; RÖDEL et al., 2012b). So zeigte sich eine Abhängigkeit der Wirkung von der Bestrahlungsdosis mit einer maximalen Wirkung bei Dosen zwischen 0,3 und 0,7 Gy (RÖDEL et al., 2012a). Es wurde eine Transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) und IL-10 abhängige Reduzierung der mononukleären Zellen beschrieben, wobei es durch die vermehrte Expression der antiinflammatorischen Zytokine TGF- β_1 und IL-10 zu einer verminderten E-Selectin-Expression auf der Oberfläche der Endothelzellen kam, welche wiederum das Vermögen der mononukleären Zellen sich an das Endothel anzuhaften, reduzierte (RÖDEL et al., 2004). Somit verweilten die Makrophagen im Blut ohne an den Ort der Entzündung zu gelangen. Eine Downregulierung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in murinen Makrophagen (RAW 264.7) und bei künstlich induzierter Arthritis von Ratten konnte ebenfalls nach LD-RT nachgewiesen werden (HILDEBRANDT et al., 1998; 2003a; 2003b). Für die gleiche Zelllinie konnte auch ein Mechanismus gezeigt werden, der zur Dephosphorylierung zweier Kinasen (Extracellular signal-regulated protein kinases, ERK1/2; p38 Mitogen-activated protein kinases, MAPK) durch die MAPK Phosphatase-1 und zu einer Abnahme der Produktion von TNF- α führt (TSUKIMOTO et al., 2009). Bei humanen Makrophagen konnte nach einer Bestrahlung von 0,5 – 0,7 Gy eine Abnahme der Sekretion von IL-1 β , einem proinflammatorischen Zytokin aus der IL-1-Familie, beobachtet werden (LÖDERMANN et al., 2012).

Auch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) konnte durch Bestrahlung mit Dosen von 0,3 – 0,6 Gy reduziert werden (SCHAUE et al., 2002).

In mehreren Untersuchungen wurde eine Modifikation des Adhäsionsverhaltens zwischen Endothelzellen und mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC) durch LD-RT nachgewiesen. So zeigten sich 4 h nach Bestrahlung mit Dosen von 0,1 – 0,5 Gy um bis zu 70 % erniedrigte Adhäsionsraten bei gleichzeitig verringerter Expression von L-Selektin der Leukozyten (KERN et al., 2000). In weiteren Experimenten konnte ebenfalls ein E-Selektin vermittelter Rückgang der Adhäsionsfähigkeit mononukleärer Zellen 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit Dosen von 0,3 – 0,6 Gy beobachtet werden; gleichzeitig kam es 12 h nach Bestrahlung zu einer Zunahme der Adhäsion (HILDEBRANDT et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die verringerte Adhäsion 4 h bzw. 24 h nach Bestrahlung mit erhöhten TGF- β_1 -Konzentrationen einherging; wohingegen 12 h nach Bestrahlung die Werte erniedrigt waren. Durch Neutralisation der TGF- β_1 -Aktivität konnte diese Wirkung aufgehoben werden (RÖDEL et al., 2004). Die erhöhte Freisetzung von TGF- β_1 nach LD-RT kann die verminderte Expression von E-Selektin und damit die Abnahme der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen erklären (DI CHIARA et al., 2000).

LD-RT kann auch zur Apoptose von mononukleären Zellen führen. Es zeigten sich relative Apoptosemaxima nach Bestrahlung im Bereich von 0,3 – 0,7 Gy (KERN et al., 1999), die zeitlich mit einer proteolytischen Abspaltung von L-Selektin assoziiert waren (KERN et al., 2000). Weiterhin wirkt sich LD-RT auf die Sekretion von Chemokinen, kleinen Signalmolekülen, die einen chemotaktischen Gradienten bilden können, aus. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Sekretion des Chemokins CCL-20 durch Strahlungsdosen von 0,5 – 1 Gy TGF- β_1 -vermittelt vermindern lässt (RÖDEL et al., 2008). Darüber hinaus führt LD-RT zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B-cells (NF κ B), der sowohl in der Entzündungsreaktion als auch in der Strahlenantwort von Zellen eine wichtige Rolle spielt (HABRAKEN & PIETTE, 2006; RÖDEL et al., 2010) und zu einer gesteigerten Expression des Apoptose-Inhibitors XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) in aktivierten Endothelzellen (RÖDEL et al., 2010) führt. In der folgenden Abbildung (Abb. 1) sind die wichtigsten antiinflammatorischen Mechanismen der LD-RT dargestellt.

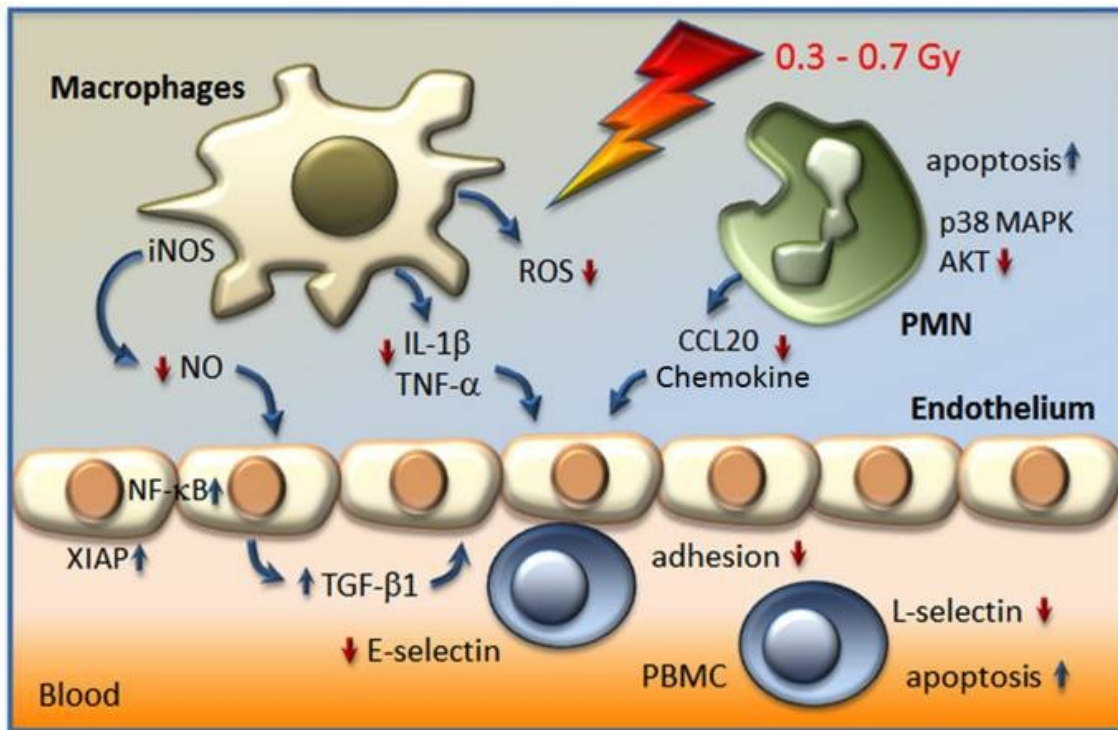


Abb. 1: Schematische Darstellung unterschiedlicher antiinflammatorischer Wirkungsmechanismen niedrig dosierter Radiotherapie; nach Rödel et al., 2012a.

Neben den bisher beschriebenen überwiegend antiinflammatorischen Eigenschaften wurden auch einige immunstimulierende Effekte durch LD-RT beschrieben. So wurden bei den Opfern des Atombombenabwurfs über Hiroshima bei Bestrahlungsdosen $\leq 1,5$ Gy erhöhte Entzündungswerte nachgewiesen (HAYASHI et al., 2003). Andere Untersuchungen zeigten eine Vermehrung von Immunzellen (BOGDÁNDI et al., 2010). Auch die Erhöhung des kardiovaskulären Risikos durch Bestrahlungsdosen > 1 Gy (SCHULTZ-HECTOR & TROTT, 2007) könnte durch eine Beeinflussung des Immunsystems bedingt sein. Dabei könnte die Bestrahlung zu einer Erhöhung der Häufigkeit von Infarkten durch Begünstigung der Atherosklerose führen. Auch könnte die Letalität von weniger akuten Infarkten, die unabhängig von der Bestrahlung auftreten, durch Verminderung der Mikrozirkulation erhöht werden (HILDEBRANDT 2010).

In den letzten Jahren wurden viele Mechanismen der Wirkung von LD-RT auf das Immunsystem aufgeklärt, dabei spielen die Endothelzellen häufig eine entscheidende Rolle. Jedoch müssen noch zahlreiche ungeklärte Fragen durch weitere Untersuchungen der komplexen Interaktionen von Immunsystem und LD-RT geklärt werden.

1.5 Zielstellung

Strahlentherapie mit niedrigen Einzeldosen unter 1 Gy wird in Deutschland seit vielen Jahrzehnten erfolgreich in der Behandlung entzündlicher Erkrankungen eingesetzt. Sie stellt eine nebenwirkungsarme Alternative zur medikamentösen Therapie dar. Obwohl zahlreiche Mechanismen dieser antiinflammatorischen Wirkungsweise bekannt sind, müssen noch viele Fragen geklärt werden, um diese vollständig zu verstehen. Wie weiter oben erläutert, konnte in unterschiedlichen Studien eine Beteiligung von Endothelzellen an dieser antiinflammatorischen Wirkung nachgewiesen werden. Der Schwerpunkt dieser Arbeit bestand deshalb darin, die Wirkung ionisierender Strahlung auf Endothelzellen näher zu untersuchen. Dabei stand der Effekt einmalig bzw. fraktioniert applizierter Strahlung im Niedrigdosisbereich (0.0125 Gy – 0,5 Gy) im Vergleich zur Wirkung hoher Dosen (1 Gy – 6 Gy) im Mittelpunkt des Interesses. Es sollte die Wirkung der Bestrahlung auf die Endothelzellen im Hinblick auf die metabolische Aktivität, das klonogene Überleben und die Freisetzung des antiinflammatorischen Zytokins TGF- β_1 untersucht werden. In diesem Zusammenhang war zudem geplant, den Einfluss einer Stimulation durch TNF- α auf die Zellen und ihre Strahlenantwort zu testen.

2 Material und Methoden

2.1 Endothelzellen

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie HV5 handelt es sich um Myokardendothelzellen der Maus. Diese Zellen sind durch ein retrovirales Konstrukt mit dem polyoma middle-sized T antigen, einem Onkogen des Polyomaviruses, welches für die Entstehung zahlreicher Tumoren verantwortlich ist, modifiziert worden. Diese Zellen stellen ein Modell für opportunistische Gefäßtumoren dar, die in immungeschwächten Mäusen auch malignes Wachstum zeigen können. Nach Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ sind sie in der Lage E-Selektin, P-Selektin und VCAM-1 an ihrer Oberfläche zu exprimieren und vermehrt Zytokine, wie IL-6 und Chemokine auszuschütten (GARLANDA et al., 1994). Sie zeigen also typische Funktionen der Endothelzellen und wurden deshalb als Endothelzellmodell in der Entzündungsreaktion verwendet (Abb. 2-3).

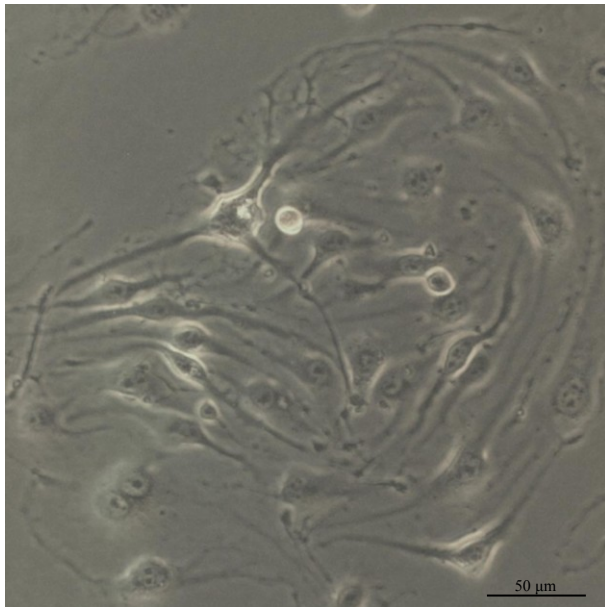


Abb. 2: Mikroskopische Darstellung der HV5-Zellen; 400x Vergrößerung.

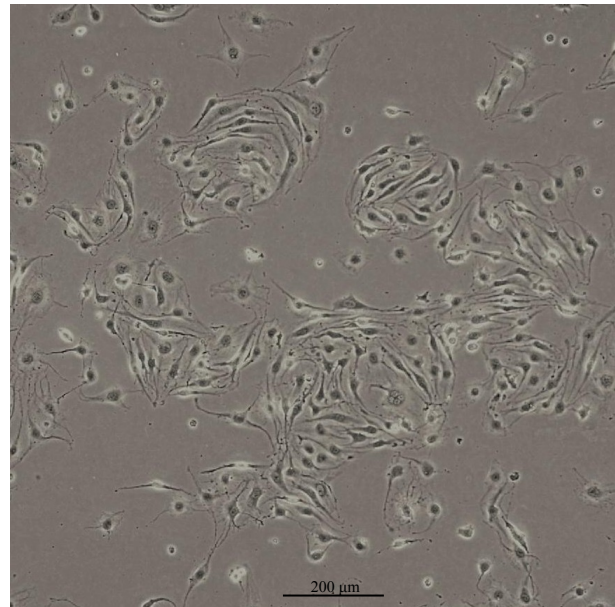


Abb. 3: Mikroskopische Darstellung der HV5-Zellen; 100x Vergrößerung.

2.1.1 Ausfrieren der Zellen

Die kryokonservierten Zellen lagen in 1 ml Kryomedium vor und wurden zunächst im 37 °C warmen Wasserbad erwärmt und in 14 ml Medium, bestehend aus 89% DMSO, 10% hitzeinaktiviertem bovinem Serum (Biochrom AG seromed®, Berlin) und 1% Penicillin/Streptomycinlösung, gelöst und anschließend für 7 min bei 200 x g bei 21 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 10 ml serumhaltigen Medium resuspendiert und auf T₇₅ oder T₂₅ Zellkulturflaschen aufgeteilt.

2.1.2 Kultivierung der Zellen

Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zellen gesplittet, um zu verhindern, dass die Zellen konfluent wurden. Hierbei wurden die Zellen 2 x mit je 10 ml PBS gespült und anschließend unter Zugabe von 6 ml 0,05 %iger Trypsinlösung für 4 min inkubiert. Die Trypsinaktivität wurde danach durch Zugabe von 9 ml serumhaltigem Medium abgestoppt und die Zelllösung für 7 min bei 200 x g und 21 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 10 ml serumhaltigem Medium resuspendiert und nach Bestimmung der Zellzahl im Coulter-Counter auf neue T₇₅ Flaschen verteilt. Das verwendete Serum wurde bei 56 °C für 60 min hitzeinaktiviert.

2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde ein Zellzählgerät verwendet. Dazu wurden 200 µl, der abtrypsinisierten Zellsuspension mit 9800 µl Isoton-Lösung verdünnt und durch Schüttelbewegungen gleichmäßig verteilt. Anschließend wurde die Lösung im Zellzählgerät Coulter-Counter Z2 der Firma Beckmann Coulter GmbH (Krefeld) analysiert und die Zellzahl elektronisch bestimmt. Die Messung erfolgte durch die Kapillare. Jedes Mal, wenn eine Zelle die Elektrode passiert, erhöht sich der Widerstand in der Kapillare. Die dadurch entstehende Spannungsänderung erzeugt für jede Zelle einen elektrischen Impuls, der gezählt wird. Für die Messung der Zahl der Endothelzellen wurde am Zellzählgerät eine Partikelgröße von 8-30 µm eingestellt. Vor der Einsaat in die Wellplatten wurden pro Zellsuspensionslösung jeweils drei Werte ermittelt und anschließend der Mittelwert berechnet.

2.2 TNF- α

TNF- α ist, wie bereits beschrieben (Kapitel 1.3), ein proinflammatorisches Zytokin und diente dazu, die Endothelzellen zu stimulieren, um ein entzündliches Geschehen zu simulieren. Das verwendete rekombinante TNF- α stammte von der Maus und wurde von der Firma R&D Systems in Dosen von 50 μ g Trockengewicht bezogen und im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde das TNF- α in 5 ml PBS gelöst, aliquotiert (100 μ l) und bei -80 °C gelagert. Aus dieser Stammlösung (10 μ g/ml) wurden die entsprechenden Verdünnungen für die jeweiligen Versuche hergestellt. Es wurden Endkonzentrationen von 10 ng, 20 ng, 50 ng und 100 ng pro ml verwendet.

2.3 Wachstumskurven

Durch das Erstellen von Wachstumskurven konnte das Wachstumsverhalten der H5V-Zellen näherungsweise beschrieben werden. Es wurde eine native Wachstumskurve der H5V Zellen erstellt und zwar mit Einsaatdichten von 1.000, 10.000 und 20.000 Zellen pro Well. Zusätzlich wurden Wachstumskurven mit Entzug des Serums am dritten Zähltag durchgeführt, um den Einfluss des Serums im Medium auf das Wachstum der H5V-Zellen zu untersuchen. Für die Versuche wurden 24-Wellplatten verwendet und jeweils als Triplikat alle 24 h nach Lösung mit 0,25 %igem Trypsin im Coulter-Counter ausgezählt. Die vollständige Ablösung der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Die im Ergebnisteil dargestellten Wachstumskurven wurden jeweils aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

2.4 Zellbestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen im Hochdosisbereich wurde mit den Linearbeschleunigern vom Typ MD 2 und ONCOR der Firma Siemens AG (Erlangen) in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie Rostock durchgeführt.

Im Linearbeschleuniger werden Elektronen mit einem hochfrequenten elektrischen Feld in der Beschleunigerröhre auf eine hohe kinetische Energie gebracht. Nach dem Austritt aus der Röhre werden die Elektronen abgebremst. Bei dieser Abbremsung der Elektronen entsteht eine hoch energetische Photonenstrahlung mit einer Energie von 6 MeV (festgelegte Maximalenergie), die auf das zu bestrahlende Objekt fokussiert wird. Zur Sicherstellung einer homogenen Bestrahlung wurden die Proben auf einer Plexiglasplatte platziert.

Die Exposition im Niedrigdosisbereich erfolgte an Orthovoltgeräten mit einer deutlich geringeren

Röhrenspannung von 200 kV. Durch die Röhrenspannung werden aus der Heizkathode Elektronen gelöst und durch die Anodenspannung beschleunigt bis sie auf eine Wolframanode prallen. Durch diesen Aufprall entsteht Bremsstrahlung, die durch unterschiedliche Filter moduliert werden kann. Für die Versuche wurde das Röntgentherapiegerät RT 200 der Firma Hille X-Ray mit 200 kV und einer Filterung durch 0,3 mm Aluminium und 2 mm Kupfer verwendet, welches im Verlauf durch das Gerät X-Strahl 200 der Firma X-Strahl (USA) ersetzt wurde. Die Röhrenspannung betrug ebenfalls 200 kV bei einer Filterung von 1 mm Aluminium und 0,45 mm Kupfer.

2.4.1 Bestrahlung für die Versuche zur Messung der metabolischen Aktivität und des klonogenen Überlebens

Für jede Versuchsreihe wurde je eine Platte für die Dosen 0 Gy; 0,0125 Gy; 0,025 Gy; 0,125 Gy; 0,25 Gy; 0,5 Gy; 1,0 Gy und 1,5 Gy für die Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät sowie je eine Platte für die Dosen 0 Gy; 1 Gy; 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy für die Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger angesetzt. Die Zellbestrahlung wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt (Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht über die Dosen der Bestrahlung der H5V-Zellen zur Bestimmung der metabolischen Aktivität (96-Well-Platten) sowie des klonogenen Überlebens (6-Well-Platten).

<i>Bestrahlung am Röntgentherapiegerät:</i>		
<i>Nr. der Wellplatte</i>	<i>Einzeldosis in Gy</i>	<i>Summe bei fraktionierter Bestrahlung in Gy</i>
<i>WP1</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>WP2</i>	<i>0,0125</i>	<i>0,05</i>
<i>WP3</i>	<i>0,025</i>	<i>0,1</i>
<i>WP4</i>	<i>0,125</i>	<i>0,5</i>
<i>WP5</i>	<i>0,25</i>	<i>1</i>
<i>WP6</i>	<i>0,5</i>	<i>2</i>
<i>WP7</i>	<i>1</i>	<i>4</i>
<i>WP8</i>	<i>1,5</i>	<i>6</i>

<i>Bestrahlung am Linearbeschleuniger:</i>		
<i>Nr. der Wellplatte</i>	<i>Einzeldosis in Gy</i>	
<i>WP1</i>	<i>0</i>	
<i>WP2</i>	<i>1</i>	
<i>WP3</i>	<i>2</i>	
<i>WP4</i>	<i>4</i>	
<i>WP5</i>	<i>6</i>	

Zunächst wurde die Einsaatdichte in den 96-Wellplatten und den 6-Wellplatten bei Bestrahlungsdosen von 0 Gy und 6 Gy (Linearbeschleuniger) ausgetestet. Nach der Einsaat in die Wellplatten folgte eine Inkubationszeit von 23 h, um danach einen Mediumwechsel mit oder ohne Zugabe von TNF- α durchzuführen. Für die Zugabe von TNF- α wurde nach dem Mediumwechsel jeweils 10 μ l Medium pro Well entnommen und 10 ng bzw. 20 ng in 10 μ l PBS gelöstem TNF- α hinzugefügt. Nach einer weiteren Stunde wurden die Platten bestrahlt. Bei der 4 x fraktionierten Bestrahlung wurden zwei Fraktionen pro Tag im Abstand von 6 h appliziert. Der Abstand zwischen der 2. und 3. Fraktion betrug 18 h (vgl. Abb. 4). Bei der Bestrahlung am Röntgentherapiegerät wurden der Tubus H und der Filter 9 (200kV) verwendet. Bei diesen Bedingungen ergab die Dosimetrie eine Dosisleistung von 0,52 Gy/min und eine maximale Abweichung der Dosis zwischen den einzelnen Wells von nicht mehr als 2 % für die 96-Wellplatten. Für die 6-Wellplatten lag die Dosisleistung bei 0,54 Gy/min bei einer maximalen Dosisabweichung von unter 3 %.

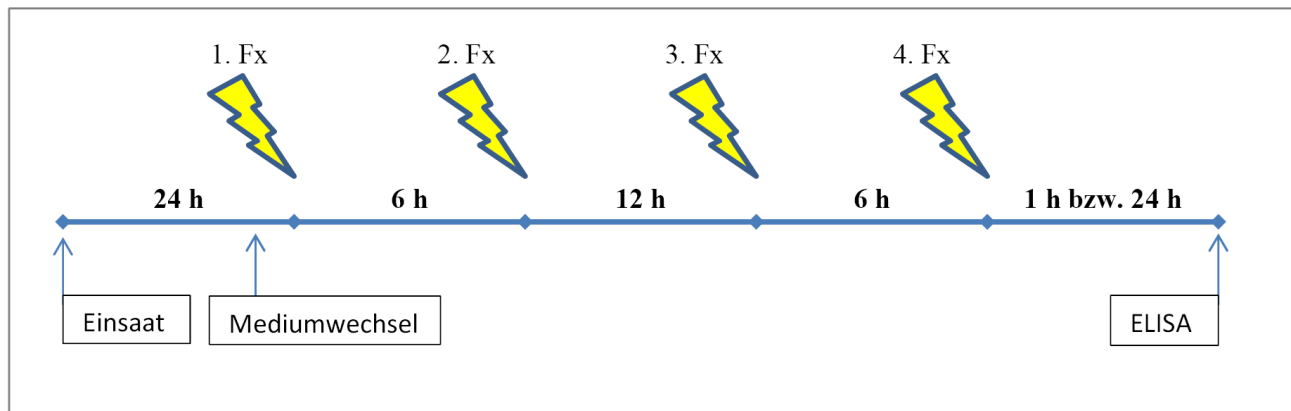


Abb. 4: Bestrahlungsschema für die vierfach fraktionierte Bestrahlung. FX= Bestrahlungsfraktion

Die Einsaat für die 6- bzw. 96-Wellplatten wurde nach dem Muster der folgenden Abbildungen durchgeführt (Abb. 5-7):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	0	0	0	0
B	0	PBS	PBS	x	x	x	x	PBS	PBS	0	0	0
C	0	PBS	x	x	x	x	x	x	PBS	PBS	0	0
D	0	PBS	x	x	x	x	x	x	x	PBS	0	0
E	0	PBS	x	x	x	x	x	x	x	PBS	0	0
F	0	PBS	x	x	x	x	x	x	PBS	PBS	0	0
G	0	PBS	PBS	x	x	x	x	PBS	PBS	0	0	0
H	0	0	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	0	0	0	0

Spalte 3:	Medium
Spalte 4:	Kontrolle (nativ)
Spalte 5:	Zugabe von 10 ng/ml TNF- α 40 min vor Bestrahlung
Spalte 6:	Zugabe von 10 ng/ml TNF- α 20 min nach Bestrahlung
Spalte 7:	Zugabe von 20 ng/ml TNF- α 40 min vor Bestrahlung
Spalte 8 u.9:	Zugabe von 20 ng/ml TNF- α 20 min nach Bestrahlung

Abb. 5: Muster für die Einsaat der Zellen in eine 96-Wellplatte für die Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät (RT 200). In die mit x markierten Wells wurden jeweils 10.000 bzw. 50.000 Zellen eingesät (Die Dosimetrie ergab, dass die gleichzeitige Bestrahlung von 36 Wells/WP möglich war, in denen die Dosisabweichung unter 2% lag).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	0	0	0
B	0	PBS	x	x	x	x	x	x	PBS	0	0	0
C	0	PBS	x	x	x	x	x	x	PBS	0	0	0
D	0	PBS	x	x	x	x	x	x	PBS	0	0	0
E	0	PBS	x	x	x	x	x	x	PBS	0	0	0
F	0	PBS	x	x	x	x	x	x	PBS	0	0	0
G	0	PBS	x	x	x	x	x	x	PBS	0	0	0
H	0	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	0	0	0

Spalte 4:	Medium
Spalte 5:	Kontrolle(nativ)
Spalte 6:	Zugabe von 10 ng/ml TNF- α 40min vor Bestrahlung
Spalte 7:	Zugabe von 10 ng/ml TNF- α 20min nach Bestrahlung
Spalte 8:	Zugabe von 20 ng/ml TNF- α 40min vor Bestrahlung
Spalte 9:	Zugabe von 20 ng/ml TNF- α 20min nach Bestrahlung

Abb. 6: Muster für die Einsaat der Zellen in eine 96-Wellplatte für die Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger. In die mit x markierten Wells wurden jeweils 10.000 bzw. 50.000 Zellen eingesät (Die Dosimetrie ergab Dosisabweichungen kleiner 3 %).

	1	2	3
	Kontrolle (nativ)	Zugabe von 10ng TNF- α 20min vor Bestrahlung	Zugabe von 10ng TNF- α 20min nach Bestrahlung
A	x	x	x
B	x	x	x

Abb. 7: Muster für Einsaat der Zellen in eine 6-Wellplatte für die Durchführung von Koloniebildungstests nach Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät bzw. mit dem Linearbeschleuniger. In die mit x markierten Wells wurden jeweils 400 bzw. 4.000 Zellen eingesät (Die Dosimetrie ergab Dosisabweichungen kleiner 3 %).

2.4.2 Bestrahlung für die Versuche zur Messung der TGF- β_1 -Sekretion

Für die Experimente zur Bestimmung der TGF- β_1 -Sekretion wurde das Gerät X-Strahl 200 der Firma X-Strahl (USA) verwendet. Dabei wurde zur Modifizierung der Bestrahlungsdosis ein Messingkeil auf den 96-Wellplatten platziert. Somit war es möglich während eines Bestrahlungsdurchgangs unterschiedliche Dosen zu applizieren. Die verwendeten Dosen betrugen 0 Gy; 0,18 Gy; 0,476 Gy; 0,81 Gy und 2,0 Gy. In der folgenden Abbildung (Abb. 8) sind die relativen Dosen im Bezug zur Maximaldosis der nicht vom Messingkeil bedeckten Spalte dargestellt. Für die in den Experimenten verwendeten Wellspalten ist zusätzlich die absolute Dosis angegeben.

Absolute Dosis		0Gy						0,18Gy		0,476 Gy	0,81Gy	2Gy	
Relative Dosis		0%		4%	4,80%	5,90%	7,30%	9,00%	14,50%	23,80%	40,50%	100%	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	0	0	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
nativ	B	x	0	PBS	PBS	PBS	PBS	x	PBS	x	x	x	PBS
nativ	C	x	0	PBS	PBS	PBS	PBS	x	PBS	x	x	x	PBS
nativ	D	x	0	PBS	PBS	PBS	PBS	x	PBS	x	x	x	PBS
10ng/ml TNF- α	E	x	0	PBS	PBS	PBS	PBS	x	PBS	x	x	x	PBS
10ng/ml TNF- α	F	x	0	PBS	PBS	PBS	PBS	x	PBS	x	x	x	PBS
10ng/ml TNF- α	G	x	0	PBS	PBS	PBS	PBS	x	PBS	x	x	x	PBS
	H	0	0	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Abb. 8: Muster für die Einsaat der Zellen in eine 96-Wellplatte für die Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät X-Strahl 200. In die mit x markierten Wells wurden jeweils 40.000 Zellen eingesät. Angabe der relativen Dosen im Bezug zur Maximaldosis; zusätzliche Angabe der absoluten Dosis für die in den Experimenten verwendeten Wells (Die Dosimetrie ergab Dosisabweichungen kleiner 2 %).

Um eine möglichst hohe und somit nachweisbare TGF- β_1 -Sekretion zu erreichen, wurden 4×10^4 Zellen 24 h vor der Bestrahlung in serumhaltiges Medium eingesät, 1 h vor der Bestrahlung erfolgte ein Wechsel auf serumfreies Medium und nach weiteren 4 h bzw. 24 h wurde der TGF- β_1 -ELISA durchgeführt.

2.5 Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels EZ4U-Test

Der EZ4U-Test der Firma Biomedica diente der Bestimmung der metabolischen Aktivität der H5V-Zellen im untersuchten Medium. Das Testprinzip beruht auf der Fähigkeit der mitochondrialen Dehydrogenase ungefärbte Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazansalze umzuwandeln. Das Substrat wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers in 2,5 ml auf 36 °C erwärmter Aktivatorflüssigkeit gelöst und auf die zu untersuchenden Wells verteilt. Durch Voruntersuchungen wurden zunächst die geeignete Einsaatdichte und die optimale Inkubationszeit ermittelt.

2.5.1 Bestimmung der optimalen Einsaatdichte und Inkubationszeit

Zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit und geeigneten Einsaatdichte wurden im Vorversuch in je 2 Spalten von vier 96er Wellplatten Zellzahlen von 5×10^2 , 1×10^3 , $2,5 \times 10^3$, 1×10^4 bzw. 2×10^4 Zellen pro Well eingesät. Nach 23 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um die gelösten Zellreste der abgestorbenen Zellen zu entfernen und die vitalen Zellen mit neuen Nährstoffen zu versorgen. Nach einer weiteren Stunde wurden zwei der vier Platten mit 6 Gy bestrahlt. Sowohl bei dem mit 6 Gy bestrahlten Ansatz als auch bei der unbestrahlten Kontrolle wurde der EZ4U-Test durchgeführt. Die Messung erfolgte alle 60 min bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz- λ 570 nm) im ELISA-Reader. So konnte ermittelt werden, ab wann sich die optische Dichte im Verlauf der Zeit nur noch geringfügig änderte; denn die Umsatzgeschwindigkeit des Formazansubstrates ist zellspezifisch. Für die weiteren Experimente wurden Einsaatdichten von 1×10^4 Zellen/Well und eine Inkubationszeit von 5 h verwendet.

2.5.2 Bestimmung der metabolischen Aktivität für die weiteren Experimente

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität wurden entweder 1×10^4 Zellen/Well für die Versuche mit Serum im Medium oder 5×10^4 Zellen/Well für die Versuche ohne Serum im Medium in eine 96-Wellplatte eingesät. Dann erfolgte entweder 1 h oder 24 h nach der Bestrahlung der Proben die

Zugabe des Formazansubstrates. Nach einer Inkubationszeit von 5 h wurde die optische Dichte spektralphotometrisch bestimmt. Anhand der Messwerte der optischen Dichte wurden durch Normierung auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, nativ = 100%) die metabolischen Aktivitäten der einzelnen Ansätze berechnet. Für jede Versuchsreihe wurde je eine 96-Wellplatte für die Dosen 0; 0,0125; 0,025; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 und 1,5 Gy (Röntgentherapiegerät) bzw. 0; 1; 2; 4 und 6 Gy (Linearbeschleuniger) angesetzt (siehe Kap. 2.3 Abb. 5 und Abb. 6). Um den Einfluss des Serums zu ermitteln, wurde der Versuch sowohl mit also auch ohne Zugabe von hitzeinaktiviertem Serum im Medium durchgeführt.

2.6 Bestimmung des klonogenen Überlebens mittels Koloniebildungstests

Mit Hilfe von Koloniebildungstests ist es möglich das klonogene Überleben von Zellen über einen längeren Zeitraum zu bestimmen. Es wird als Plattiereffizienz ermittelt (gebildete Kolonienzahl pro eingesäte Zellenzahl). Mit diesem Test sollte das Überleben der Zellen nach der Bestrahlung untersucht werden und darüber hinaus der Effekt auf die Strahlensensibilität der Endothelzellen durch TNF- α beurteilt werden. Um einen Koloniebildungstest sinnvoll auswerten zu können, muss die Einsaatdichte so gewählt werden, dass einerseits in der unbehandelten und nicht bestrahlten Kontrolle (0 Gy, ohne TNF- α) nur so viele Kolonien gebildet werden, dass diese aufgrund ihrer Dichte noch ausgezählt werden können. Andererseits sollten auch bei maximal erwarteter Reduzierung (6 Gy, 20 ng/ml TNF- α) möglichst noch genügend Kolonien vorhanden sein, um den Effekt quantifizieren und statistisch auswerten zu können. Aus diesem Grund wurde in den Vorversuchen eine geeignete Einsaatdichte ermittelt.

2.6.1 Bestimmung der optimalen Einsaatdichte der Koloniebildungstests

Um die optimale Einsaatdichte zu ermitteln, wurden in je einer 6-Wellplatte 100, 200 und 400 Zellen als Duplikat eingesät. Davon wurde jeweils eine Platte nach 24 h mit 6 Gy am Linearbeschleuniger bestrahlt. 10 Tage nach der Einsaat wurden die Zellen nach Abgießen des Mediums 10 min in 70 %igem vergälltem Ethanol fixiert, 2 min mit 1 %iger Kristallviolett-Lösung gefärbt und anschließend zweimal mit Leitungswasser gespült. Nach Trocknung über Nacht wurden die Kolonien ausgezählt. Hierbei wurden Kolonien, die aus mindestens 50 Zellen bestanden, gezählt und daraus die Plattiereffizienz berechnet. Aus den Vorversuchen wurde eine optimale Einsaatdichte von 400 Zellen/Well für die weiteren Versuche festgelegt. Für die später beschriebenen

modifizierten Versuche mit temporärem Serumentzug wurde eine Einsaatdichte von 4×10^3 Zellen pro Well verwendet.

2.6.2 Bestimmung des klonogenen Überlebens für die weiteren Experimente

Für jede Versuchsreihe wurden je eine 6-Wellplatte für die Dosen 0; 0,0125; 0,025; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 und 1,5Gy (Röntgentherapiegerät) bzw. 0; 1; 2; 4 und 6 Gy (Linearbeschleuniger) angesetzt (siehe Kap. 2.3, Abb. 7). Um den Einfluss des Serums zu ermitteln, wurde der Versuch sowohl mit Zugabe hitzeinaktivierten Serums (Biochrom) als auch ohne Zugabe von Serum im Medium durchgeführt.

2.7 Bestimmung der TGF- β_1 -Freisetzung mittels Immunoassay

Mit dem TGF- β_1 -Immunoassay kann die Konzentration des Entzündungsmarkers TGF- β_1 im Zellüberstand der H5V-Zellen gemessen werden. Für diesen Test wurde ein kommerziell erhältliches Kit der Firma R&D Systems (Abingdon, United Kingdom) verwendet. Hierbei wurde der Zellüberstand jeweils entweder 4 h oder 24 h nach Bestrahlung (0 Gy; 0,18 Gy; 0,48 Gy und 2 Gy) entnommen und der Test gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die Proben in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und zunächst bei $10.000 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Danach wurde das lösliche TGF- β_1 durch Zugabe von 20 μ l 1 N HCl-Lösung pro 100 μ l Zellüberstand aktiviert, die Einwirkzeit betrug dabei 10 min. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 13 μ l 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES-Lösung neutralisiert. Die jeweils 50 μ l der aktivierten Proben wurden anschließend in die mit TGF- β_1 -Antikörpern beschichteten und mit 50 μ l RD1-21-Lösung befüllten Wells überführt. Für die Standardkurve wurde parallel dazu eine Verdünnungsreihe aus dem in bekannter Konzentration vorliegenden TGF- β_1 hergestellt und als Duplikat analog zum Zellüberstand in die mit 50 μ l RD1-21-Lösung befüllten Wells pipetiert. Entsprechend wurde mit zwei zusätzlichen Kontrollen verfahren. Nach Zugabe der aktivierten Proben, Lösung der Standardkurven und Kontrollen wurde die Wellplatte für 2 h inkubiert, um die Anlagerung des löslichen TGF- β_1 an die in den Wellplatten verankerten Antikörper sicherzustellen. Anschließend wurden die Proben aspiriert und viermal mit Waschpuffer gewaschen. Nach Ausklopfen der Wells wurde ein mit dem Enzym Thyreoperoxidase gekoppelter polyklonaler TGF- β_1 -Antikörper zugegeben und der Ansatz wiederum für 2 h inkubiert. Danach wurde erneut viermal aspiriert, gewaschen und ausgeklopft. Anschließend wurden 100 μ l pro Well Substratlösung

zugegeben und für 30 min inkubiert. In dieser Zeit wurde das farblose Substrat zu einem farbigen Produkt umgesetzt. Schließlich wurde eine Stopp-Lösung zugegeben und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz- λ 570 nm) gemessen.

2.8 Statistische Analyse

Die statistischen Berechnungen wurden mit dem „Student's t-Test“ durchgeführt. Dabei wurde für Berechnungen der Abweichung vom auf 100 % normierten Kontrollwert der zweiseitige Einstichproben-t-Test und für den Vergleich andere Werte der zweiseitige Zweistichproben-t-Test verwendet. Die Varianzen der Stichproben wurden als gleich angenommen. Werte von $p \leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet. Bei den Untersuchungen zur Bestimmung des klonogenen Überlebens wurden auf Basis der Messwerte Fitkurven mit Hilfe des Computerprogramm Microsoft Excel 2010 nach dem Linear-Quadratischen-Modell (LQ-Modell) erstellt.

2.9 Materialien und Geräte

Zellkulturmedium:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
Fetal Bovine Serum (FBS)
Penicillin/Streptomycin

Hersteller, Ort

PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Biochrom AG seromed®, Berlin
PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Kultivierung und Zellzahlbestimmung:

Phosphate buffered Saline (PBS) –Dulbecco
Trypsin/EDTA (0,05%; 0,25%)
Isoton-Lösung

Biochrom AG seromed®, Berlin
PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Beckmann Coulter GmbH, Krefeld

Verbrauchsmaterialien:

Falconröhrchen (15 ml oder 50 ml)
Zellkulturflaschen (T₂₅ oder T₇₅)
Pipettenspitzen
Kryoröhrchen

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Nalgene® Labware, VWR International
GmbH, Darmstadt

Multiwellplatten (6, 24 bzw. 96 Loch)

TPP (Techno Plastic Products AG),
Trasadingen, Schweiz oder Greiner Bio-One
GmbH, Frickenhausen

Geräte:

Begasungsbrutschrank I

Zapf Instruments, Sarstedt

Begasungsbrutschrank II

Varolab® GmbH, Giesen

Sicherheitswerkbank

Zapf Instruments, Sarstedt

Coulter Counter Z2

Beckmann Coulter GmbH, Krefeld

Laborzentrifuge I, Hettich Universal 16 R

Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen

Laborzentrifuge II, Hettich Rotina 420 R

Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen

Phasenkontrast-Mikroskop Eclipse

Nikon, Düsseldorf

4er Objektiv (Plan Fluor 4x/0.13 PhLDL)

Nikon, Düsseldorf

10er Objektiv (Plan Fluor 4x/0.13 PhLDL)

Nikon, Düsseldorf

ELISA- Reader, anthos zenyth 340 r

anthos Mikrosysteme GmbH

Kaiser Leuchtplatte (prolite basic)

Genius TechnoConsult, München

Testkits

EZ4U, Zellproliferationsassay

Hersteller, Ort

Biomedica Medizinprodukte

Ansatz GmbH & Co KG, Wien

TGF- β_1 Immunoassay

R&D Systems, Abingdon, United Kingdom

Zellfärbung

Ethanol (70%) ,vergällt

Zentralapotheke des Universitätsklinikums

Rostock

Kristallviolett-Lösung 1%

Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

TNF- α -Stimulation

Rekombinantes TNF- α der Maus

R&D Systems, Abingdon, United Kingdom

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumskurven

Zur Beurteilung der Wachstumsgeschwindigkeit der H5V-Zellen wurden native Wachstumskurven über einen Zeitraum von 7 Tagen in 24-Wellplatten erstellt. Dabei wurden unterschiedliche Einsaatdichten verwendet und der Einfluss des Serums auf das Wachstum der Zellen untersucht. Alle 24 h wurde ein Triplet mit dem Coulter-Counter ausgezählt und die Zellzahl pro ml als Funktion der Zeit (Zähltag) dargestellt.

Wachstumskurven werden in der Regel in vier Phasen unterteilt. Nach Einbringung einer bestimmten Zellzahl beginnt die sogenannte Lag-Phase, in dieser Zeit werden die zum Abbau des Substrats nötigen Enzyme gebildet, eine Zellvermehrung findet in dieser Phase noch nicht statt. In der sich anschließenden Log-Phase kommt es zu einem exponentiellen Wachstum der Zellen. Durch Verbrauch des Substrats oder Bildung von wachstumshemmenden Stoffwechselprodukten geht das Wachstum in die Plateau-Phase über. Hier ist die Wachstumsgeschwindigkeit noch geringfügig höher als die Absterberate. Wenn die Zellen in dieser Phase nicht regelmäßig mit Nährstoffen versorgt werden, kommt es zum Absterben der Zellen (Freshney et al., 2010b).

3.1.1 Native Wachstumskurven mit Serum

Die nativen Wachstumskurven der H5V-Zellen sind in Abb. 9 dargestellt. Die Einsaatdichten für die nativen Wachstumskurven lagen bei 1×10^3 , 1×10^4 bzw. 2×10^4 Zellen/ml.

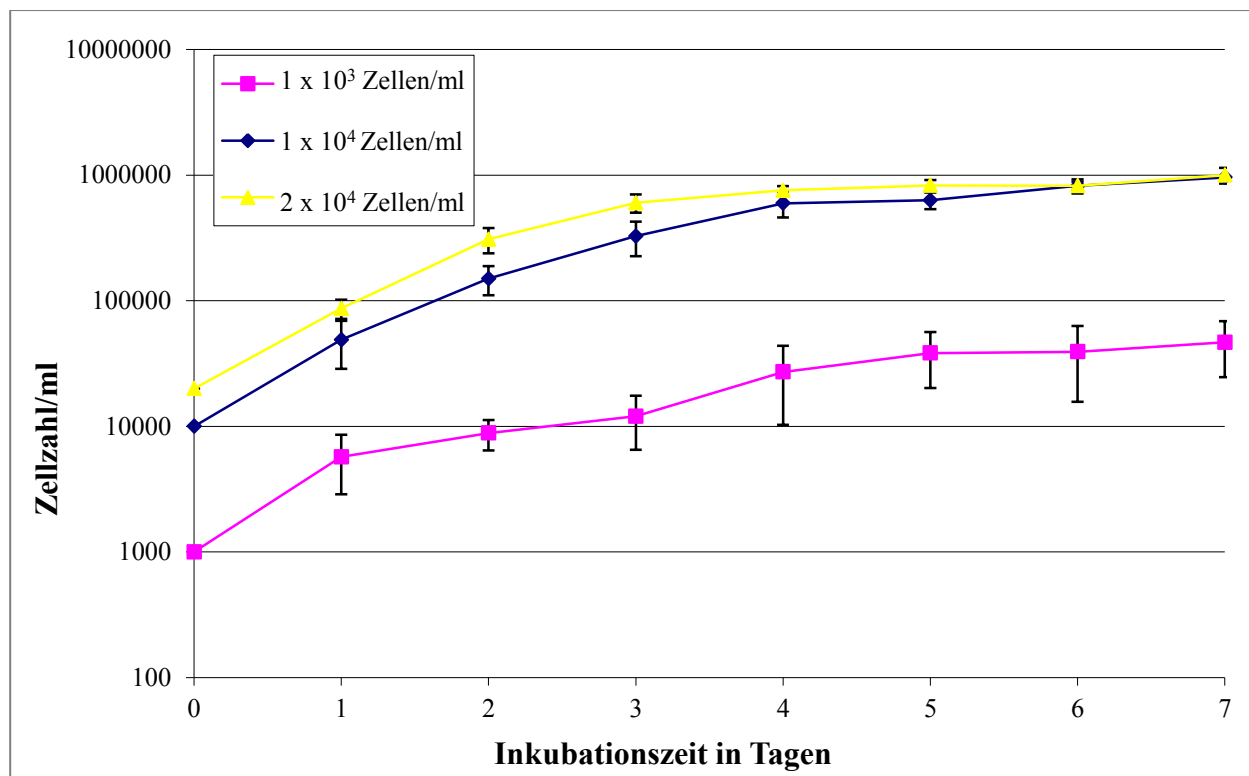


Abb. 9: Native Wachstumskurven der H5V-Zellen bei unterschiedlichen Einsaatdichten. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3).

Bei allen drei Zellkonzentrationen war die Lag-Phase so kurz, dass die HV5-Zellen bereits 24 h nach der Einsaat die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten. Die stationäre Phase wurde drei bis vier Tage nach der Einsaat erreicht. Die Zellpopulationsverdopplungszeit der H5V-Zellen wurde zwischen Tag 1 und Tag 2 berechnet und betrug 14,9 h für die Einsaatdichte 1×10^4 Zellen/ml, 13,1 h für die Einsaatdichte 2×10^4 Zellen/ml sowie 39,6 h für die Einsaatdichte 1×10^3 Zellen/ml.

3.1.2 Wachstumskurven unter Entzug des Serums im Medium

Bei der Untersuchung des Einflusses des Serums auf das Wachstum der H5V-Zellen wurde eine Einsaatdichte von 2×10^4 Zellen/ml verwendet, da sich diese Einsaatdichte als am schwankungsärmsten dargestellt hatte (siehe Abb. 9). Das serumhaltige Medium wurde nach dem dritten Inkubationstag durch serumfreies Medium ersetzt, während in einer Kontrollgruppe ein Mediumwechsel ohne Entzug des Serums durchgeführt wurde. Beide Kurven sind in Abb. 10 dargestellt.

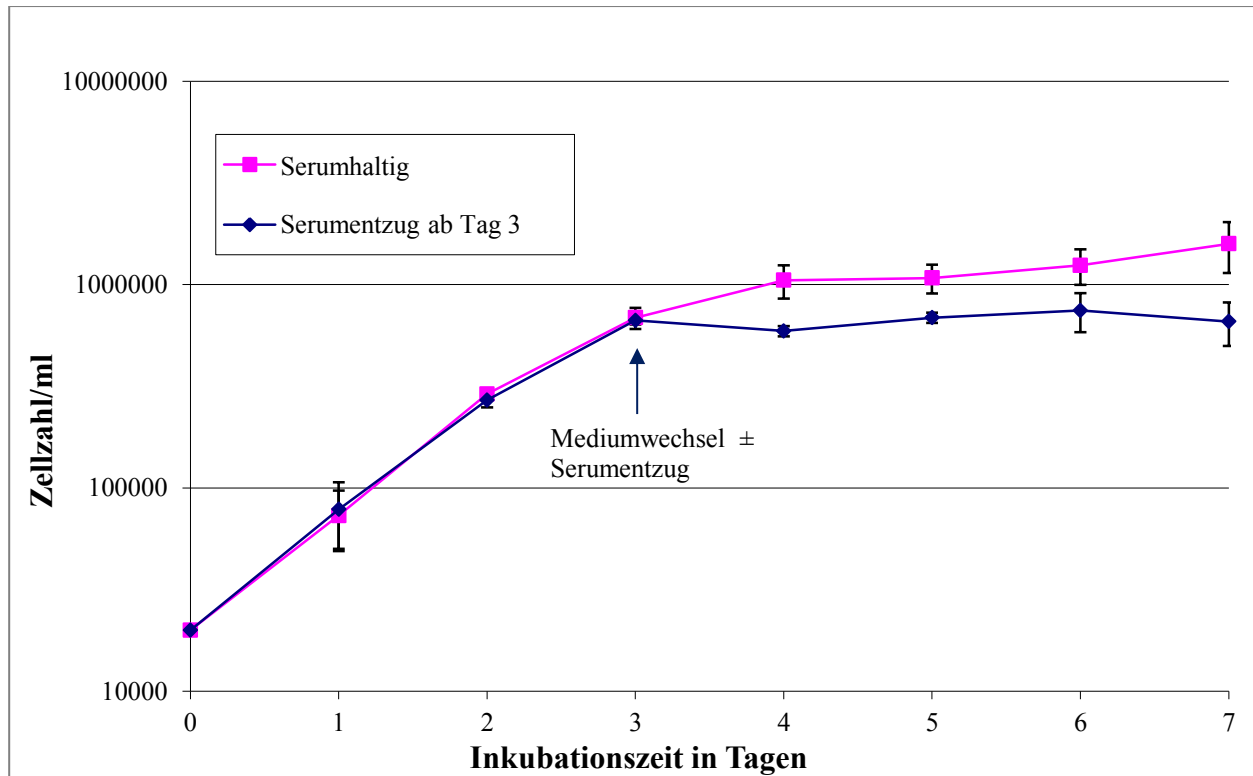


Abb. 10: Native Wachstumskurve der H5V-Zellen bei einer Einsaatdichte von 2×10^4 Zellen/ml mit und ohne Entzug des Serums am dritten Zähltag. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3).

In Abb. 10 zeigte sich, dass die Zellen durch den Entzug des Serums mit sofortiger Wirkung in einen Wachstumsstopp versetzt werden konnten. Es kam sogar zu einem geringfügigen Rückgang der Zellzahl am 1. Tag nach dem Serumentzug (Tag 4). Bereits am 2. Tag nach dem Serumentzug stabilisierte sich die Zellzahl in etwa auf Ausgangsniveau und die Zellen konnten ohne signifikant erhöhte Absterberate für mehrere Tage weiterkultiviert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die H5V-Zellen auch ohne Serum für mehrere Tage vital bleiben. Die Zellpopulationsverdopplungszeiten zwischen Tag 1 und Tag 2 lagen bei 12,1 h bzw. 13,5 h und entsprachen damit in etwa dem Wert (13,1 h) für die Einsaatdichte 2×10^4 aus dem vorangegangenen Versuch.

3.2 Metabolische Aktivität der H5V-Zellen

Durch die Verwendung des EZ4U-Tests konnte die metabolische Aktivität durch Bestimmung der optischen Dichte photometrisch am ELISA-Reader gemessen werden. Durch Normierung auf die unbestrahlte Kontrolle ohne Zugabe von TNF- α konnte die metabolische Aktivität der einzelnen Ansätze bestimmt werden. Diese stellt ein Maß für die Zahl metabolisch aktiver Zellen im untersuchten Medium dar.

3.2.1 Vorversuch zur Einsaatdichtebestimmung

Für die Bestimmung der optimalen Einsaatdichten wurden Konzentrationen von 5×10^2 , 1×10^3 , $2,5 \times 10^3$ sowie 1×10^4 Zellen/ml verwendet und die optische Dichte stündlich photometrisch bestimmt. Die optischen Dichten wurden dann als Funktion der Zeit 1 h nach Bestrahlung (Abb. 11) bzw. 24 h nach Bestrahlung (Abb. 12) analysiert. Die Versuche wurden jeweils nach Bestrahlung mit einer Dosis von 6 Gy am Linearbeschleuniger bzw. ohne Bestrahlung (Kontrolle) durchgeführt.

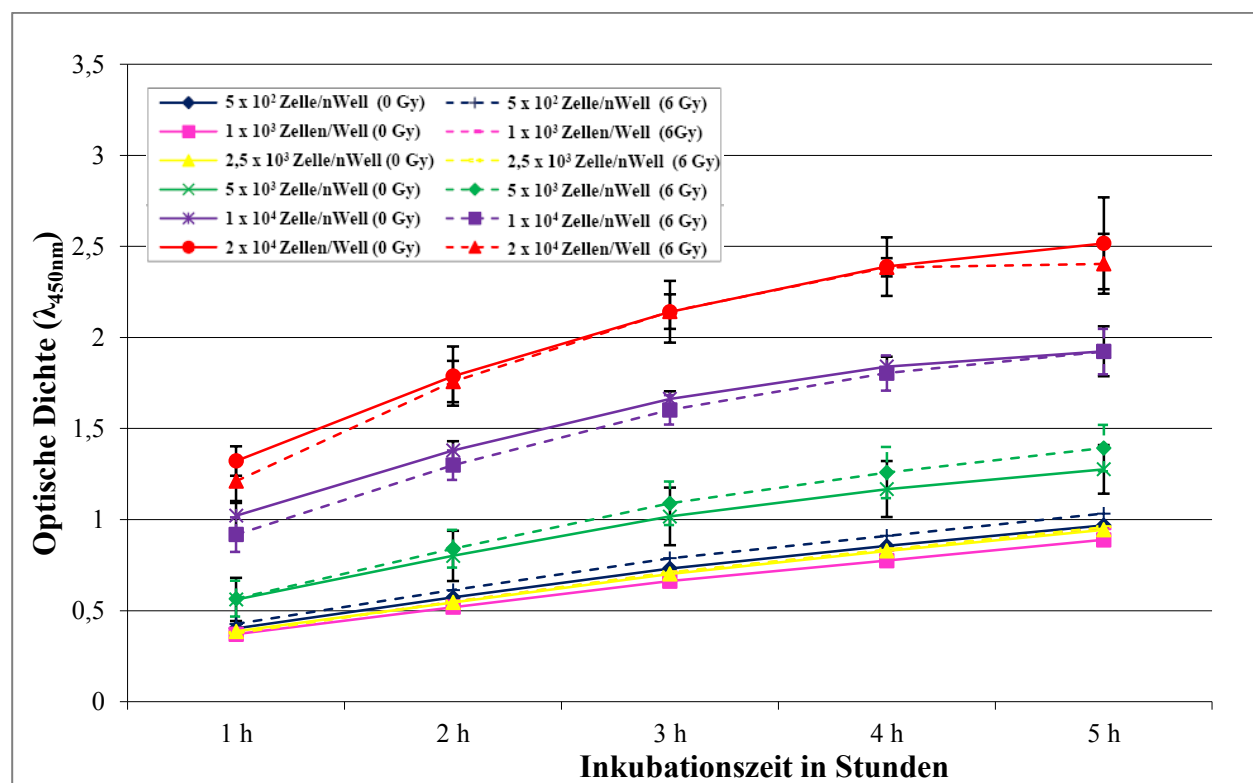


Abb. 11: Veränderung der optischen Dichten im zeitlichen Verlauf bei Durchführung des EZ4U-Tests 1 h nach Bestrahlung. Dargestellt ist die OD bei unterschiedlichen Einsaatdichten bei 0 Gy (Kontrollen) und nach Bestrahlung mit 6 Gy. Dargestellt sind MW \pm SD aus 8 Wells eines Versuches (n=1).

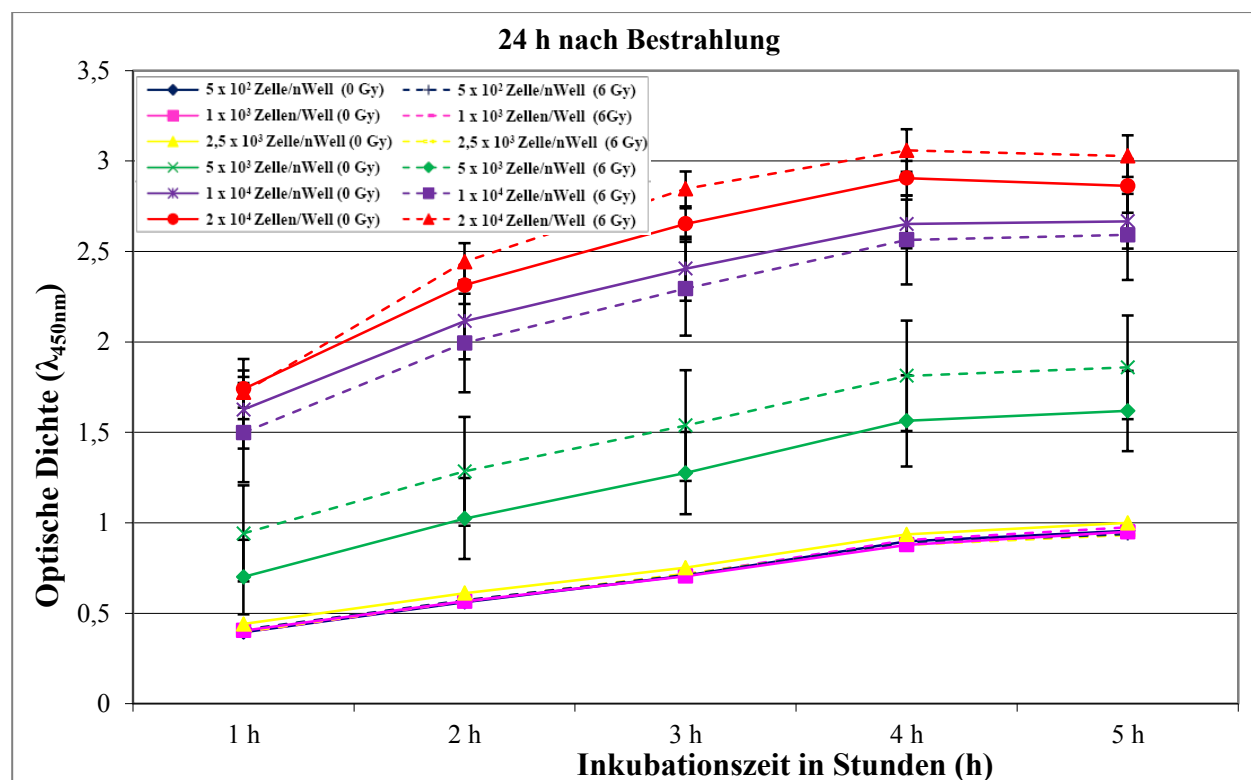


Abb. 12: Veränderung der optischen Dichten im zeitlichen Verlauf bei Durchführung des EZ4U-Tests 24 h nach Bestrahlung. Dargestellt sind unterschiedliche Einsaatdichten bei 0 Gy und nach Bestrahlung mit 6 Gy. Dargestellt sind MW \pm SD aus 8 Wells eines Versuches (n=1).

In den Abb. 11 und 12 ist die optische Dichte in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit unterschiedlichen Einsaatdichten bei 0 Gy oder nach Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 6 Gy bei einer Inkubation von 1 h bzw. 24 h nach Bestrahlung dargestellt. Dabei wurde im Verlauf der Inkubation jeweils ein Anstieg der optischen Dichte beobachtet. Die Ausgangswerte der optischen Dichte waren 24 h nach Bestrahlung (Abb. 12) deutlich höher als 1 h nach Bestrahlung (Abb. 11). Dies kann durch die Vermehrung der Zellen während der zusätzlichen 23 h Inkubationszeit erklärt werden. Die Werte für die Einsaatdichten von 5×10^2 , 1×10^3 sowie $2,5 \times 10^3$ Zellen/Well lagen so dicht beieinander, dass nur minimalste Unterschiede in der optischen Dichte nachgewiesen werden konnten.

Bei den höheren Zellkonzentrationen korrelierte die optische Dichte mit der Zellzahl, jedoch nicht mit der Bestrahlung. Dies galt sowohl für die Werte 1 h nach Bestrahlung als auch für jene 24 h nach Bestrahlung. Bei Beginn der Auswertung 1 h nach Bestrahlung zeigte sich, dass bei den hohen Einsaatdichten von 2×10^4 und 1×10^4 Zellen/Well der mit 6 Gy bestrahlten Gruppen die metabolische Aktivität geringfügig verringert war, wohingegen bei der niedrigeren Zellzahl von 5×10^3 Zellen/Well eine Erhöhung der metabolischen Aktivität zu beobachten war (Abb. 11).

Auch 24 h nach Bestrahlung (Abb. 12) zeigte sich für die unterschiedlichen Einsaatdichten teilweise eine gegenläufige Wirkung der Bestrahlung. So waren in den bestrahlten Gruppen bei den Einsaatdichten von 2×10^4 sowie 5×10^3 Zellen/Well die optischen Dichten im Vergleich zu den unbestrahlten Proben erhöht, wohingegen sie bei einer Zellzahl von 1×10^4 Zellen/Well erniedrigt war. Sowohl 1 h als auch 24 h nach Bestrahlung zeigten sich ab einer Inkubationszeit von 5 h nur noch geringfügige Veränderungen der optische Dichte, deshalb wurde für alle folgenden Messungen die Inkubationszeit nach Zugabe des Formazansubstrates auf 5 h festgelegt. Als Einsaatdichte wurde für nachfolgende Versuche 1×10^4 Zellen/Well gewählt.

3.2.2 Metabolische Aktivität nach einmaliger Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät

Für die Hauptversuche wurden jeweils 10^3 Zellen pro Well eingesät; 23 h nach der Einsaat wurde ein Wechsel des serumhaltigen Mediums durchgeführt, dabei wurden entweder 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml oder 0 ng/ml TNF- α (native Kontrolle) hinzugefügt. 24 h nach Einsaat wurde die Bestrahlung durchgeführt und anschließend entweder 1 h (Abb. 13) oder 24 h nach Bestrahlung (Abb. 14) die metabolische Aktivität bestimmt.

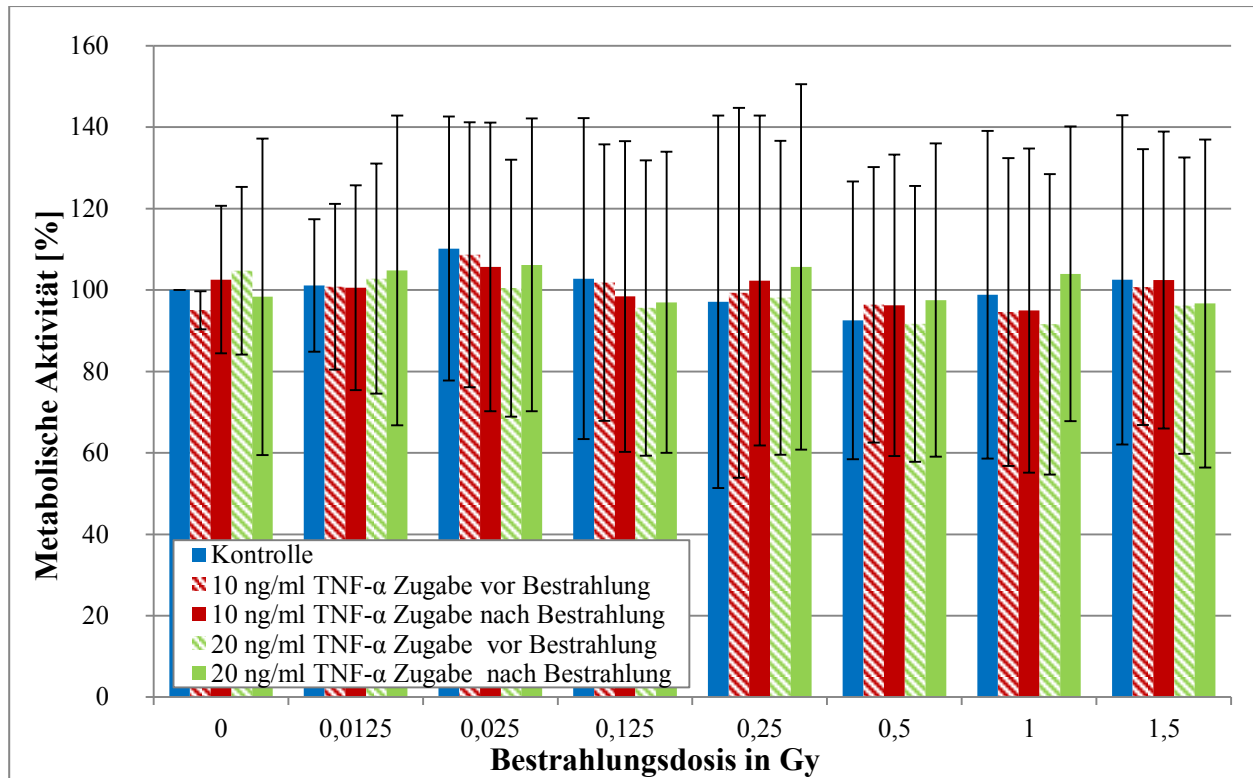


Abb. 13: Metabolische Aktivität der H5V-Zellen 1 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von TNF- α vor oder nach Bestrahlung. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3) normiert auf die unbehandelte Probe (0 Gy, 0 ng/ml TNF- α).

1 h nach Bestrahlung (Abb. 8) zeigte sich nach einem initialen minimalen Anstieg tendenziell ein leichter nicht signifikanter Abfall der metabolischen Aktivität mit einem Minimum bei 0,5 Gy. Eine signifikante Veränderung durch die Zugabe von TNF- α war nicht nachweisbar.

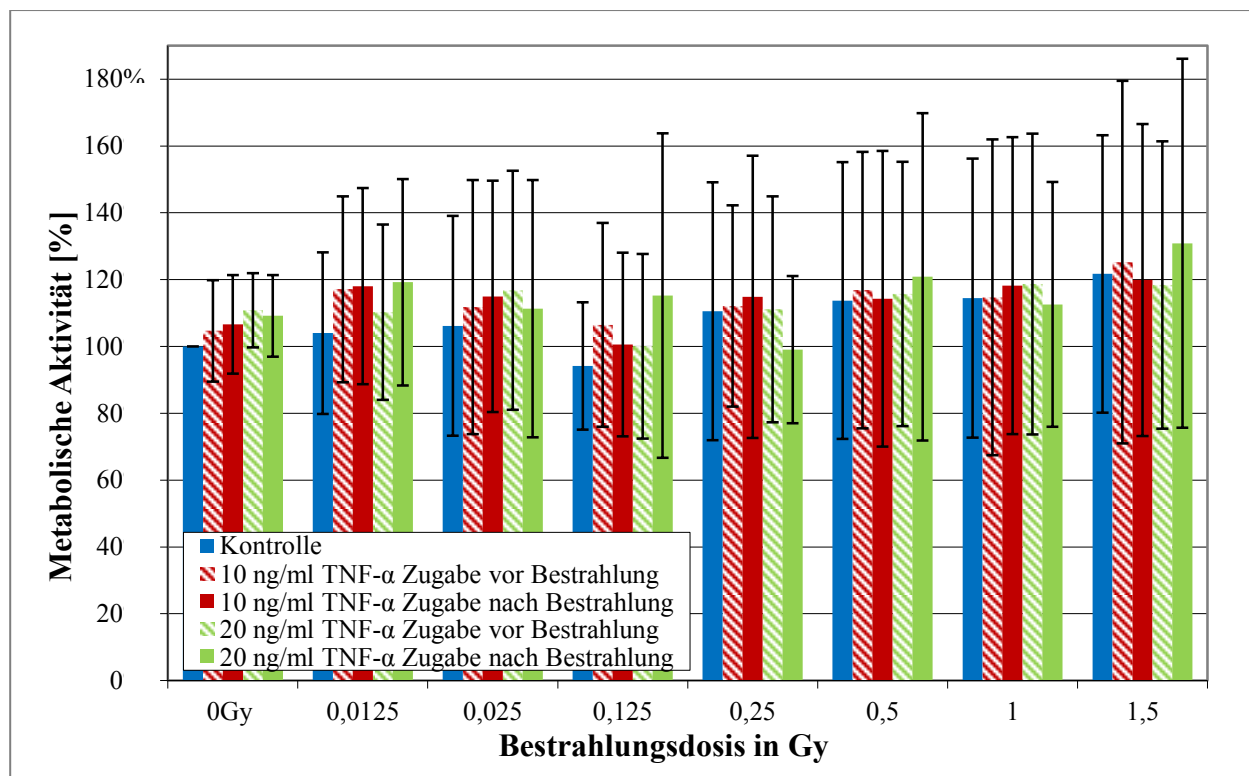


Abb. 14: Metabolische Aktivität der H5V-Zellen 24 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von TNF- α vor oder nach Bestrahlung. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3), normiert auf die unbehandelte Probe (0 Gy, 0 ng/ml TNF- α).

24 h nach Bestrahlung (Abb. 14) zeigte sich hingegen ein leichter nicht signifikanter Anstieg der metabolischen Aktivität mit zunehmender Bestrahlungsdosis. Erniedrigte Werte zeigten sich lediglich bei Bestrahlungsdosen von 0,125 Gy und teilweise auch 0,25 Gy. Weder 1 h noch 24 h nach Bestrahlung wurde ein Effekt von TNF- α beobachtet. Die relativ hohen Standardabweichungen sind vermutlich zum Großteil Ursache von Ungenauigkeiten bei der Einsaat. Die Konzentration des TNF- α wurde auf 50 ng/ml bzw. 100 ng/ml erhöht und die metabolische Aktivität erneut 1 h (Abb. 15) sowie 24 h (Abb. 16) nach Bestrahlung gemessen.

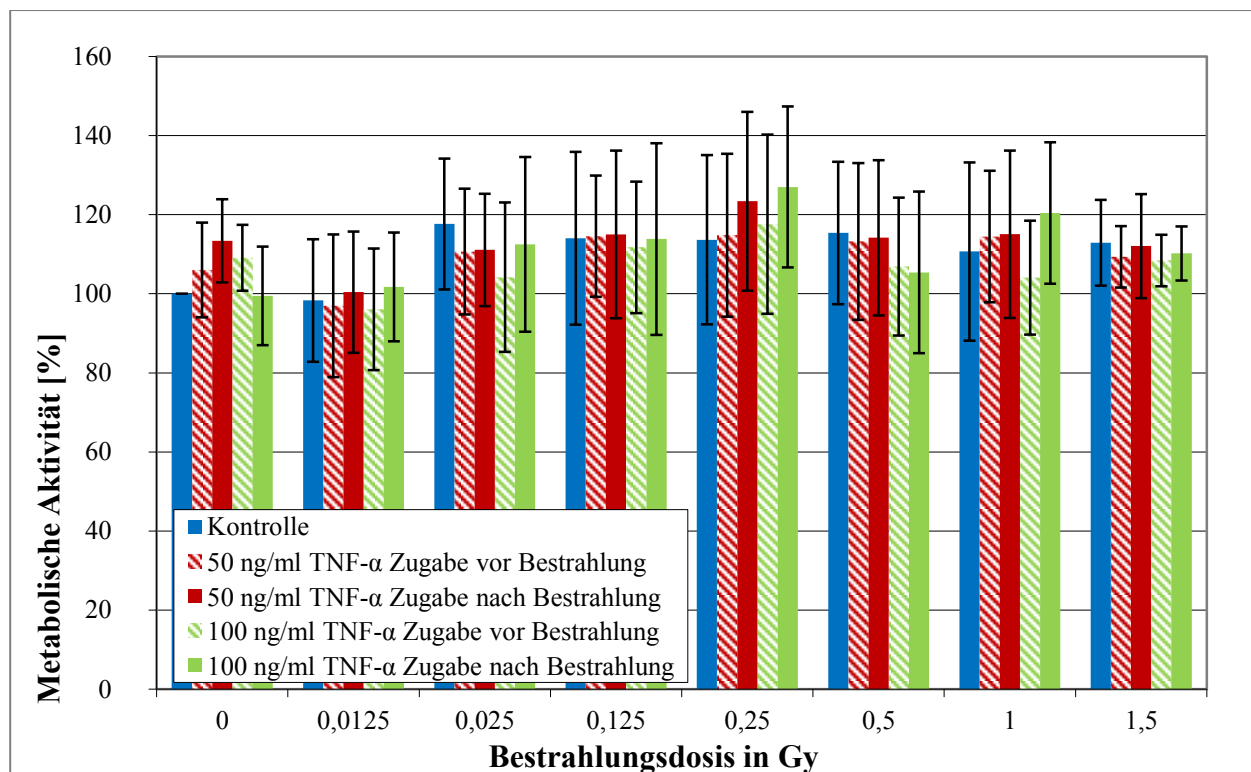


Abb. 15: Metabolische Aktivität der H5V-Zellen 1 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von TNF- α vor oder nach Bestrahlung. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3), normiert auf die unbehandelte Probe (0 Gy, 0 ng/ml TNF- α).

Bei den Experimenten 1 h nach Bestrahlung und Behandlung mit den höheren Konzentrationen von 50 ng/ml bzw. 100 ng/ml TNF- α (Abb. 15) kam es bei Bestrahlungsdosen ab 0,025 Gy zu leicht erhöhten Werten der metabolischen Aktivität. Dies war sowohl bei allen Konzentrationen von TNF- α als auch bei den unbehandelten Kontrollen der Fall. Die Zugabe von TNF- α führt je nach Bestrahlungsdosis teils zu geringfügig erhöhten (0 Gy, 0,25 Gy) und teils zu erniedrigten Werten (0,025 Gy, 0,5 Gy) der metabolischen Aktivität. Dies galt sowohl bei Zugabe vor als auch bei Zugabe nach der Bestrahlung. Insgesamt schienen sich jedoch auch die höheren Konzentrationen (50 ng/ml, 100 ng/ml) von TNF- α 1 h nach Bestrahlung nicht auf die metabolische Aktivität der H5V-Zellen auszuwirken.

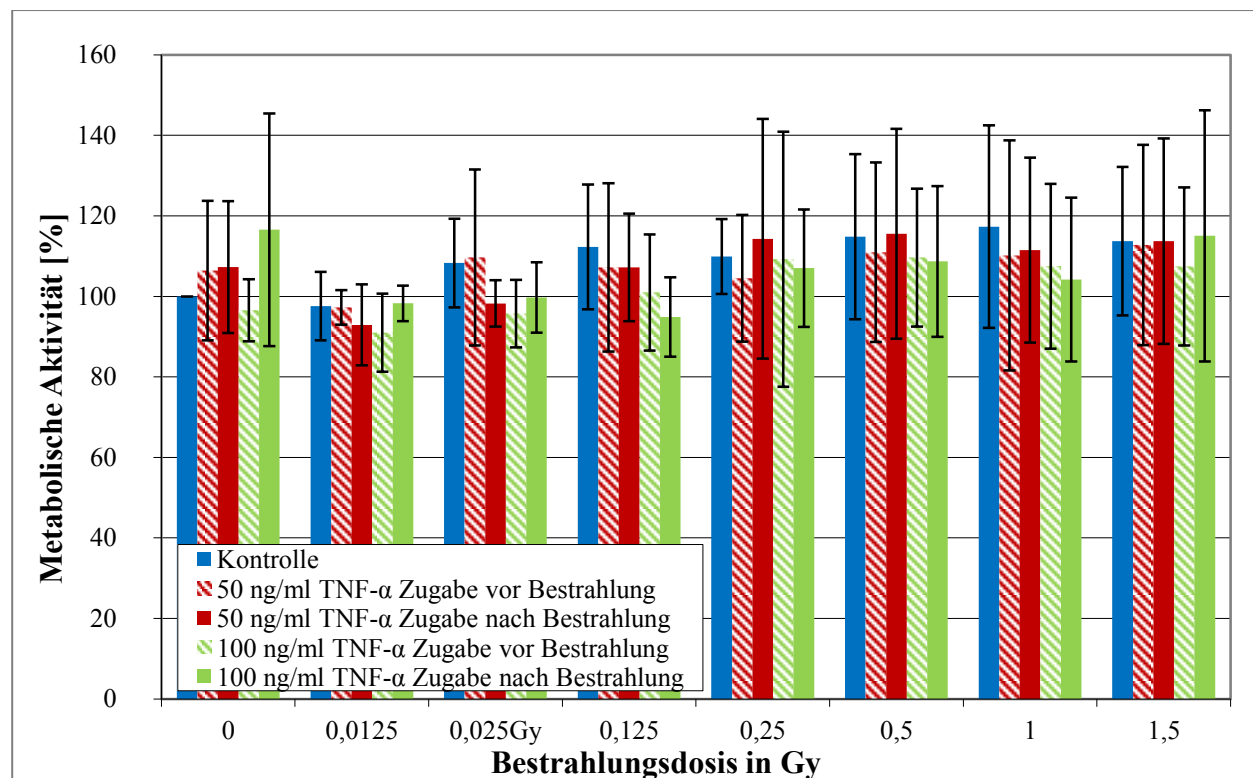


Abb. 16: Metabolische Aktivität der H5V-Zellen 24 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von TNF- α vor oder nach Bestrahlung. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3) normiert, auf die unbestrahlte Probe ohne Zugaben von TNF- α (0 Gy, 0 ng/ml TNF- α).

Auch 24 h nach Bestrahlung (Abb. 16) führte die Erhöhung der TNF- α -Konzentration nicht zum deutlichen Nachweis eines Effektes. Es zeigten sich insbesondere bei Zugabe der Konzentration von 100 ng/ml TNF- α vor Bestrahlung für die meisten Dosen minimale nicht signifikante Erniedrigungen der metabolischen Aktivität im Vergleich zur nativen Kontrolle. Wobei dies aufgrund der hohen Standardabweichung nicht als Hinweis für eine Wirkung von TNF- α gewertet wurde. Bestrahlungsdosen ab 0,025 Gy führten tendenziell zu einer geringfügigen Zunahme der metabolischen Aktivität mit zunehmender Bestrahlungsdosis. Da diese Resultate nicht erwartet wurden, wurde für die weiteren Experimente auf die Zugabe des hitzeinaktivierten Serums im Medium verzichtet, um festzustellen, ob bereits Inhaltsstoffe des Serums möglicherweise einen Effekt auf die H5V-Zellen haben und damit die Wirkung von TNF- α unterbinden. Dazu wurde beim Mediumwechsel 1 h vor Bestrahlung das serumhaltige Medium durch serumfreies Medium ersetzt. Die metabolischen Aktivitäten sind für 1 h nach Bestrahlung (Abb. 17) sowie 24 h nach Bestrahlung (Abb. 18) dargestellt.

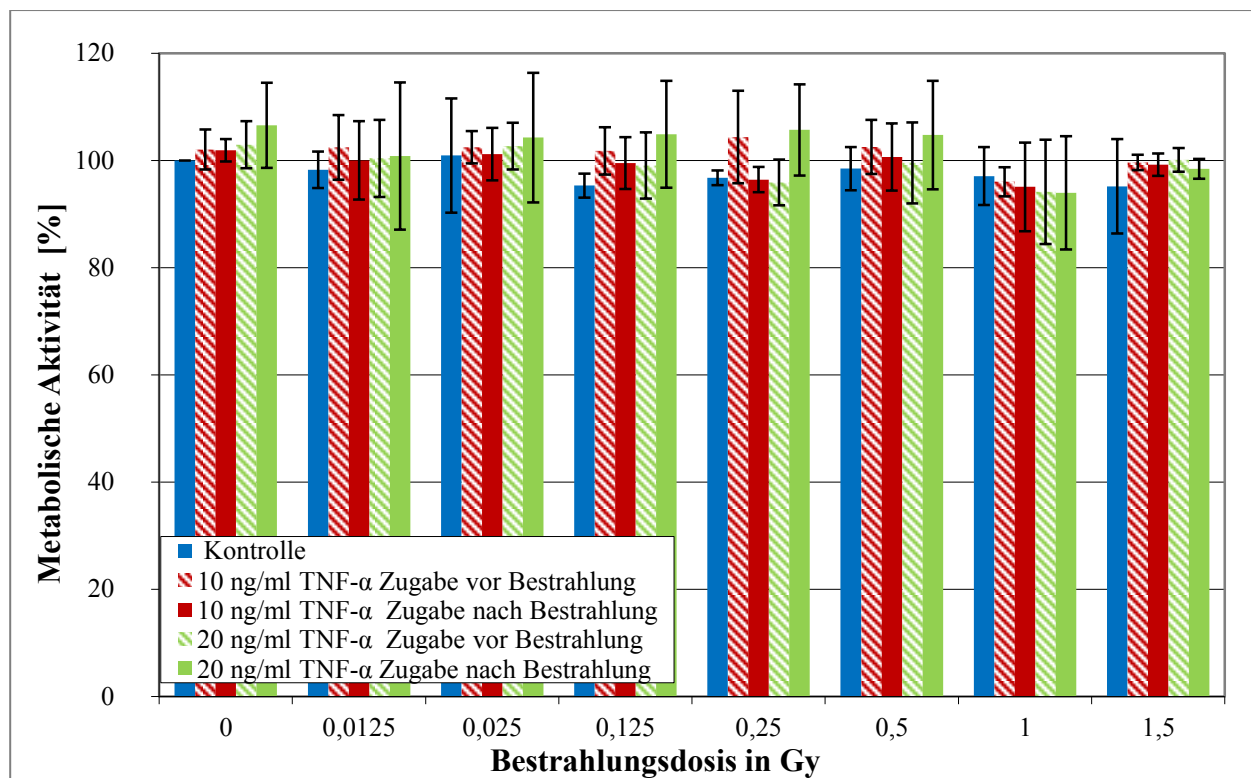


Abb. 17: Metabolische Aktivität der ohne Serum inkubierten H5V-Zellen 1 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät bei Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α vor oder nach der Bestrahlung. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3), normiert auf die ebenfalls ohne Serum inkubierte, unbestrahlte Probe ohne Zugabe von TNF- α (0 Gy, 0 ng/ml TNF- α).

1 h nach Bestrahlung (Abb. 17) war wiederum kein signifikanter Nachweis eines Effektes durch die Bestrahlung oder die Zugabe von TNF- α nachweisbar. Es zeigten sich im Vergleich zu den vorangehenden Versuchen jedoch deutlich kleinere Standardabweichungen. Möglicherweise kann dies dadurch erklärt werden, dass durch den Serumentzug die Zellproliferation stagniert (vgl 3.1.2, Abb. 10) und mögliche Störfaktoren sich somit weniger bemerkbar machen können.

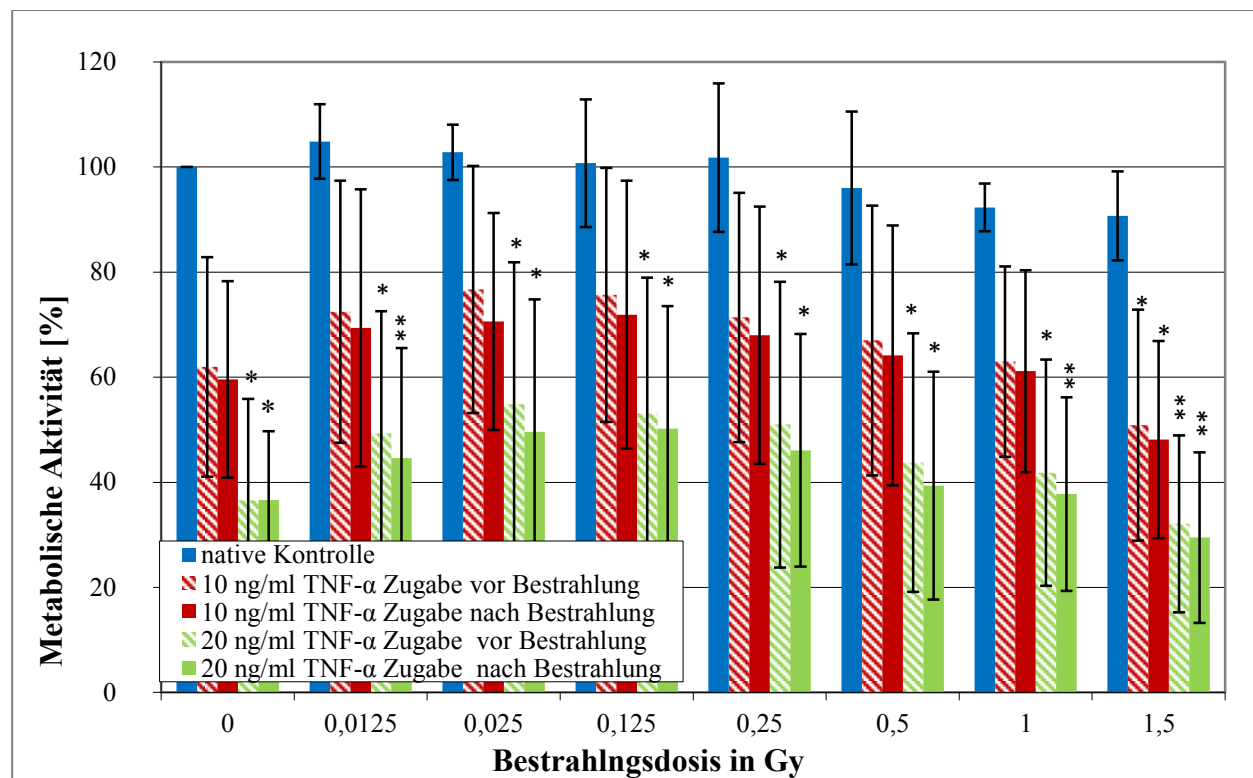


Abb. 18: Metabolische Aktivität der ohne Serum inkubierten H5V-Zellen 24 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät bei Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α vor oder nach der Bestrahlung. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3), normiert auf die ebenfalls ohne Serum inkubierte, unbestrahlte Probe ohne Zugabe von TNF- α (0 Gy, 0 ng/ml TNF- α). * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ bezogen auf die unbehandelten Werte (blaue Balken) derselben Bestrahlungsdosis.

Während 1 h nach Bestrahlung (Abb. 17) kein Effekt beobachtet werden konnte, kam es bei den ohne Serum inkubierten Zellen 24 h nach Bestrahlung (Abb.18) zu einer Erniedrigung der metabolischen Aktivität in denjenigen Proben, in denen TNF- α zugegeben wurde. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig und signifikant für die Konzentration von 20 ng/ml TNF- α .

Niedrigste Bestrahlungsdosen von bis zu 0,025 Gy führten im Vergleich zur Kontrolle zu geringfügig höheren Werten der metabolischen Aktivität, wohingegen diese bei höheren Dosen ab 0,125 Gy wieder abnahm. Diese Tendenz zeigte sich bei allen Ansätzen, war jedoch nicht signifikant. Der Zeitpunkt der Zugabe (vor bzw. nach Bestrahlung) von TNF- α war von untergeordneter Bedeutung. Die Zugabe vor Bestrahlung führte zu geringfügig höheren Werten der metabolischen Aktivität.

3.2.3 Metabolische Aktivität nach fraktionierter Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät

Zusätzlich zur einmaligen Bestrahlung sollte getestet werden, ob auch eine fraktionierte Bestrahlung der Zellen einen Einfluss auf deren metabolische Aktivität hat. Dafür wurden jeweils 5×10^3 Zellen pro Well eingesät. 23 h nach der Einsaat wurde ein Mediumwechsel mit Entzug des Serums durchgeführt. Dabei wurden entweder 10 ng/ml, 20 ng/ml oder kein TNF- α (Kontrolle) vor oder nach der Bestrahlung hinzugefügt. Die vier Bestrahlungsfractionen wurden 24 h, 30 h, 42 h und 48 h nach der Einsaat durchgeführt. Anschließend wurde entweder 1 h (Abb.19) oder 24 h nach Bestrahlung (Abb. 20) die metabolische Aktivität bestimmt (vgl. Kapitel 2.4.1, Abb. 4).

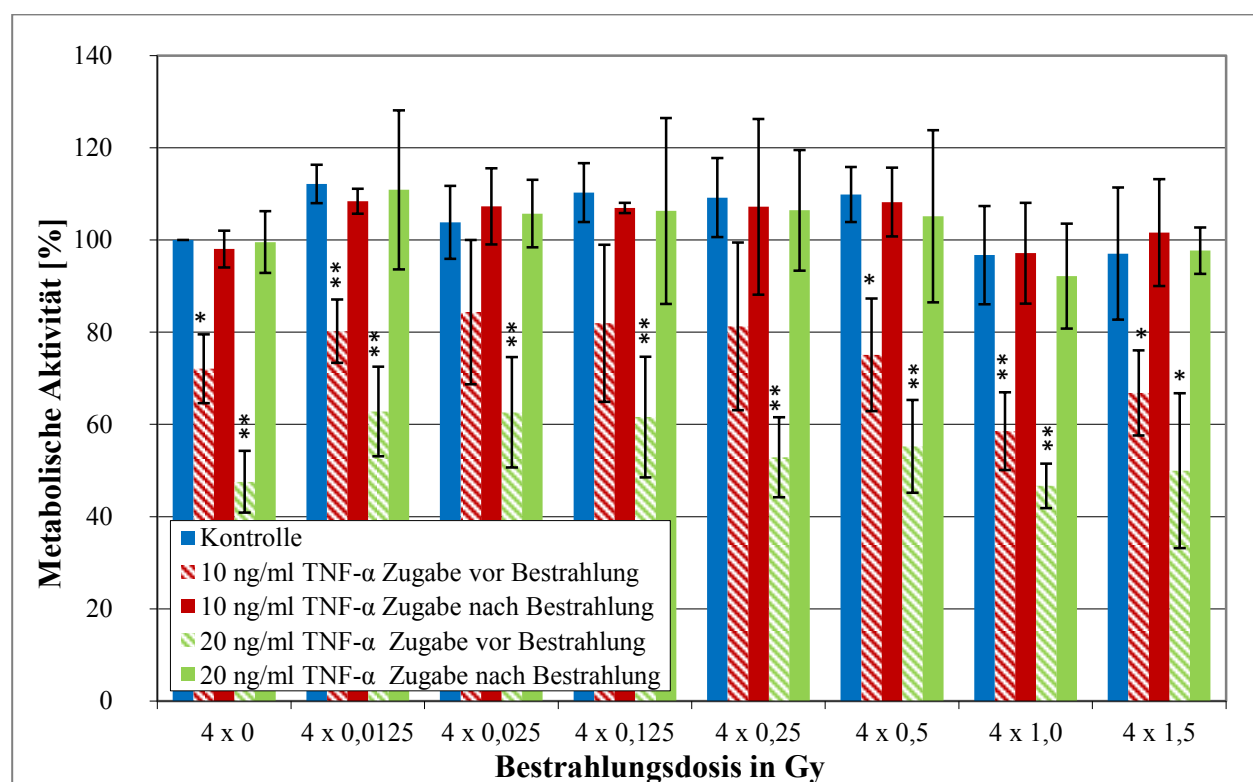


Abb. 19: Metabolische Aktivität der serumfrei inkubierten HSV-Zellen 1 h nach fraktionierter Bestrahlung (4 x) mit dem Röntgentherapiegerät bei Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α vor oder nach Bestrahlung. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3), normiert auf die unbestrahlte Probe ohne Zugabe von TNF- α (0 Gy, 0 ng/ml TNF- α). * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ bezogen auf die unbehandelten Werte (blaue Balken) derselben Bestrahlungsdosis.

Bei der fraktionierten Bestrahlung war bei den Versuchen mit TNF- α -Zugabe vor Bestrahlung bereits 1 h nach der letzten Bestrahlungsfraction ein deutlicher Effekt sichtbar. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der metabolischen Aktivität mit zunehmender Konzentration von TNF- α . Bei Zugabe des TNF- α nach Bestrahlung war dieser Effekt nicht vorhanden. Dies wurde darauf

zurückgeführt, dass sich die fraktionierte Bestrahlung über 24 h hinzog und somit bei der Zugabe von TNF- α vor Bestrahlung die Einwirkungszeit 25 h betrug, während bei den Versuchen mit TNF- α -Zugabe nach Bestrahlung diese lediglich 1 h betrug und für einen Effekt nicht auszureichen schien. Dies war auch in den Versuchen mit Bestrahlung von Einzeldosen der Fall (vgl. Kapitel 3.22, Abb. 17). Allerdings zeigte sich bei den Versuchen 1 h nach fraktionierter Bestrahlung (Abb. 19) ein geringfügiger Anstieg der metabolischen Aktivität für Einzeldosen bis 0,025 Gy (Gesamtdosis 0,1 Gy). Daraufhin folgte mit zunehmender Bestrahlungsdosis tendenziell ein leichter Rückgang der metabolischen Aktivität. Lediglich bei der Bestrahlung mit Einzeldosen von 1,5 Gy (Gesamtdosis 6 Gy) zeigte sich nochmals ein leichter Anstieg der metabolischen Aktivität.

Bei Bestimmung der metabolischen Aktivität 24 h nach der letzten Bestrahlungsfraction (Abb. 20) zeigte sich gegenüber der ohne TNF- α behandelten Kontrolle wiederum eine Reduktion der metabolischen Aktivität abhängig von Konzentration und Einwirkzeit von TNF- α .

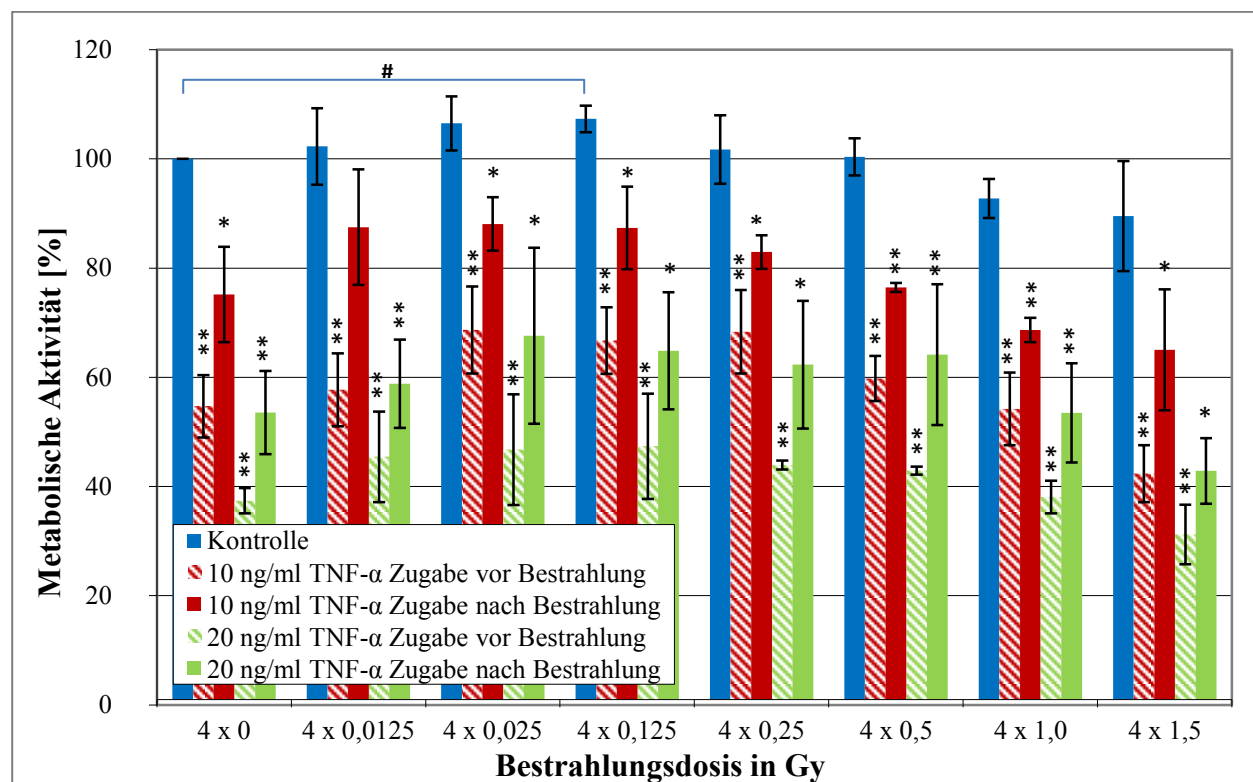


Abb. 20: Metabolische Aktivität der serumfrei inkubierten H5V-Zellen 24 h nach fraktionierter Bestrahlung (4 x) mit dem Röntgentherapiegerät bei Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α vor oder nach Bestrahlung. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3), normiert auf die unbestrahlte Probe ohne Zugabe von TNF- α (0 Gy, 0 ng/ml TNF- α). * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ bezogen auf die unbehandelten Werte (blaue Balken) derselben Bestrahlungsdosis; # = $p \leq 0,05$ bezogen auf die unbestrahlte Probe (0 Gy) desselben Ansatzes.

Wie in Abb. 20 zu erkennen ist, verliefen die Werte der unterschiedlichen Bestrahlungsdosen dabei in etwa parallel zur Kontrollkurve mit geringfügig zunehmenden metabolischen Aktivitäten bei den sehr niedrigen Dosen bis 0,025 Gy (Gesamtdosis 0,1 Gy) und teilweise auch 0,125 Gy (Gesamtdosis 0,5 Gy). Anschließend folgte eine sukzessive Abnahme mit minimalen Werten bei Einzeldosen von 1,5 Gy (Gesamtdosis 6 Gy). Die Behandlung mit der höheren TNF- α -Konzentration von 20 ng/ml und deren Zugabe vor Bestrahlung entsprach einer effektiven Einwirkzeit von 48 h und führte gegenüber den Kontrollen bei allen Bestrahlungsdosen zur stärksten Reduktion der metabolischen Aktivität.

Die Zugabe von TNF- α nach der Bestrahlung entsprach einer effektiven Einwirkzeit von 24 h und war somit nur halb so lang wie bei Zugabe vor Bestrahlung. Dementsprechend lagen die Werte der metabolischen Aktivität erwartungsgemäß deutlich höher. Beim Vergleich der metabolischen Aktivitäten der höheren Konzentration von TNF- α und der kürzeren Einwirkungszeit (20 ng/ml TNF- α , Zugabe nach Bestrahlung) mit der niedrigeren Konzentration von TNF- α und der längeren Einwirkungszeit (10 ng/ml TNF- α , Zugabe vor Bestrahlung) zeigte sich, dass diese Werte in etwa gleich hoch lagen. Die Probe mit der niedrigeren Konzentration von TNF- α und der kürzeren Einwirkungszeit (10 ng/ml TNF- α , Zugabe nach Bestrahlung) ergab, verglichen mit der höheren Konzentration (20 ng/ml TNF- α) und/oder der längeren Einwirkungszeiten (Zugabe nach Bestrahlung), entsprechend die geringste Reduktion der metabolischen Aktivität gegenüber den Kontrollen.

3.2.4 Metabolische Aktivität nach Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger

0 – 6 Gy

Analog zu den Versuchen mit dem Röntgentherapiegerät, wurden auch am Linearbeschleuniger zunächst Versuche mit hitzeinaktiviertem Serum im Medium durchgeführt. Die metabolische Aktivität der H5V-Zellen wurde 1 h (Abb. 21) sowie 24 h nach Bestrahlung (Abb. 22) bestimmt.

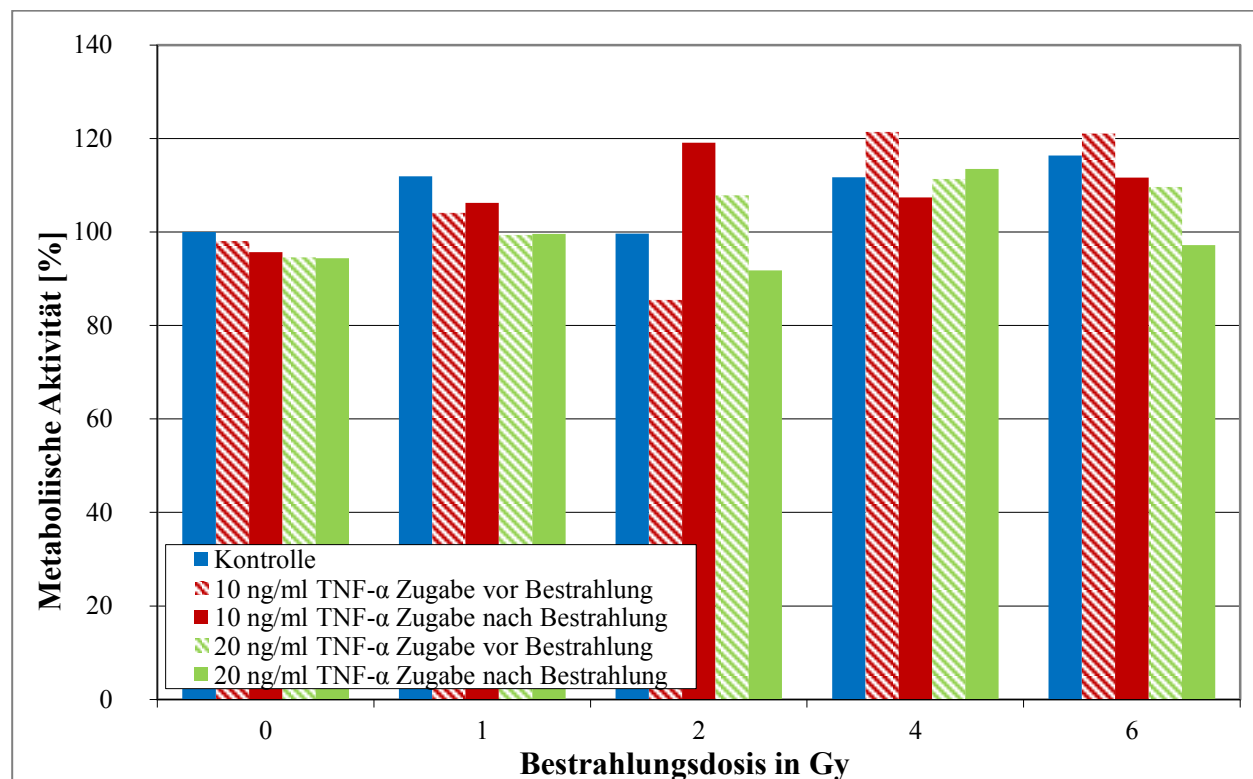


Abb. 21: Metabolische Aktivität der H5V-Zellen 1 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger bei Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α vor oder nach Bestrahlung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 6 Wells, normiert auf die unbestrahlte Probe ohne Zugabe von TNF- α (n=1).

Es zeigte sich 1h nach Bestrahlung eine geringfügige Zunahme der metabolischen Aktivität. Die Zugabe von TNF- α führte tendenziell zu geringfügig geringeren Werten. Da aufgrund der vorangehenden Versuche unter Verwendung von Serum kein Effekt zu erwarten war, wurde dieser Versuch nur einmal durchgeführt.

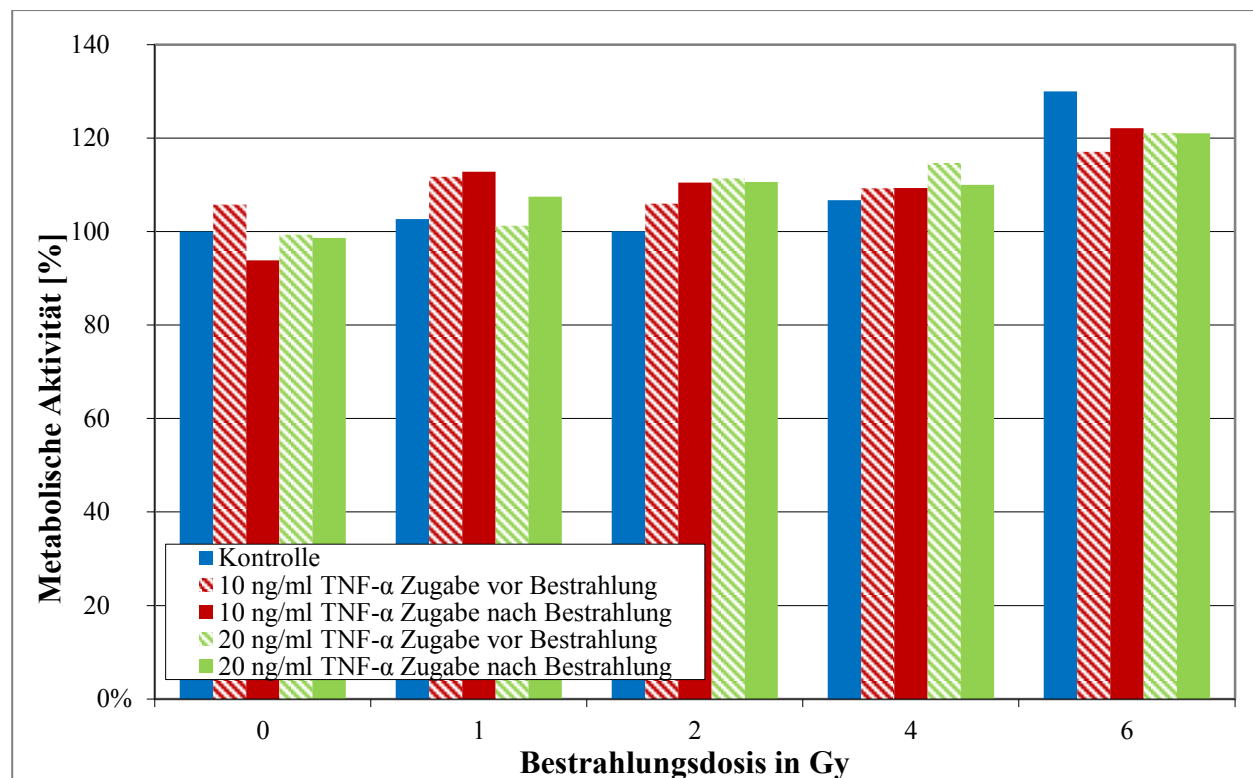


Abb. 22: Metabolische Aktivität der H5V-Zellen 24 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger bei Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α vor oder nach der Bestrahlung; dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 6 Wells eines Versuchs.

Auch 24 h nach Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger (Abb. 22) zeigte sich eine geringfügige Zunahme der metabolischen Aktivität mit zunehmender Dosis der Bestrahlung. Ein Effekt von TNF- α konnte nicht nachgewiesen werden. Da auch in Kenntnis der Versuche mit dem Röntgentherapiegerät keine nachweisbaren Effekte zu erwarten waren, wurde der Versuch ebenfalls nicht wiederholt.

Das Versuchsprotokoll wurde nun so verändert, dass beim Mediumwechsel 1 h vor Bestrahlung das serumhaltige Medium durch serumfreies Medium ersetzt wurde, um zu überprüfen, ob das Serum einen Effekt von TNF- α verhindern kann. Die metabolische Aktivität der in serumfreien Medium inkubierten H5V-Zellen wurde 1 h (Abb. 23) sowie 24 h nach Bestrahlung (Abb. 24) bestimmt.

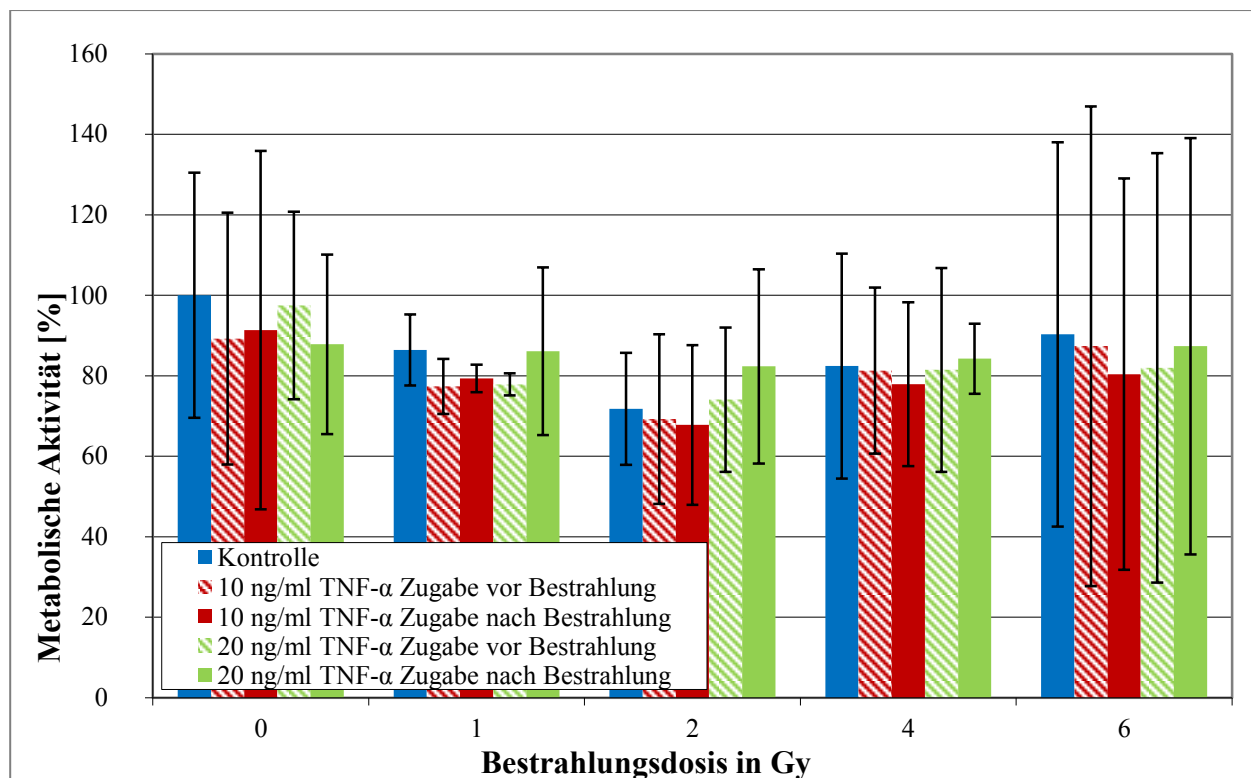


Abb. 23: Metabolische Aktivität der ohne Serum inkubierten H5V-Zellen 1 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger bei Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α vor oder nach der Bestrahlung. Dargestellt sind MW \pm SD (n=2), normiert auf die unbestrahlte Probe ohne Zugabe von TNF- α .

1 h nach Bestrahlung (Abb. 23) konnte sich wiederum analog der Versuche am Röntgentherapiegerät kein Effekt von TNF- α nachweisen lassen. Es zeigte sich eine minimale Abnahme der metabolischen Aktivität mit zunehmender Bestrahlungsdosis. Die absoluten Werte waren im Vergleich zum zellfreien Medium nur geringfügig höher. Dies ist vermutlich auch die Ursache für die sehr hohe Standardabweichung. Dieser Versuch wurde deshalb nur zweimal durchgeführt.

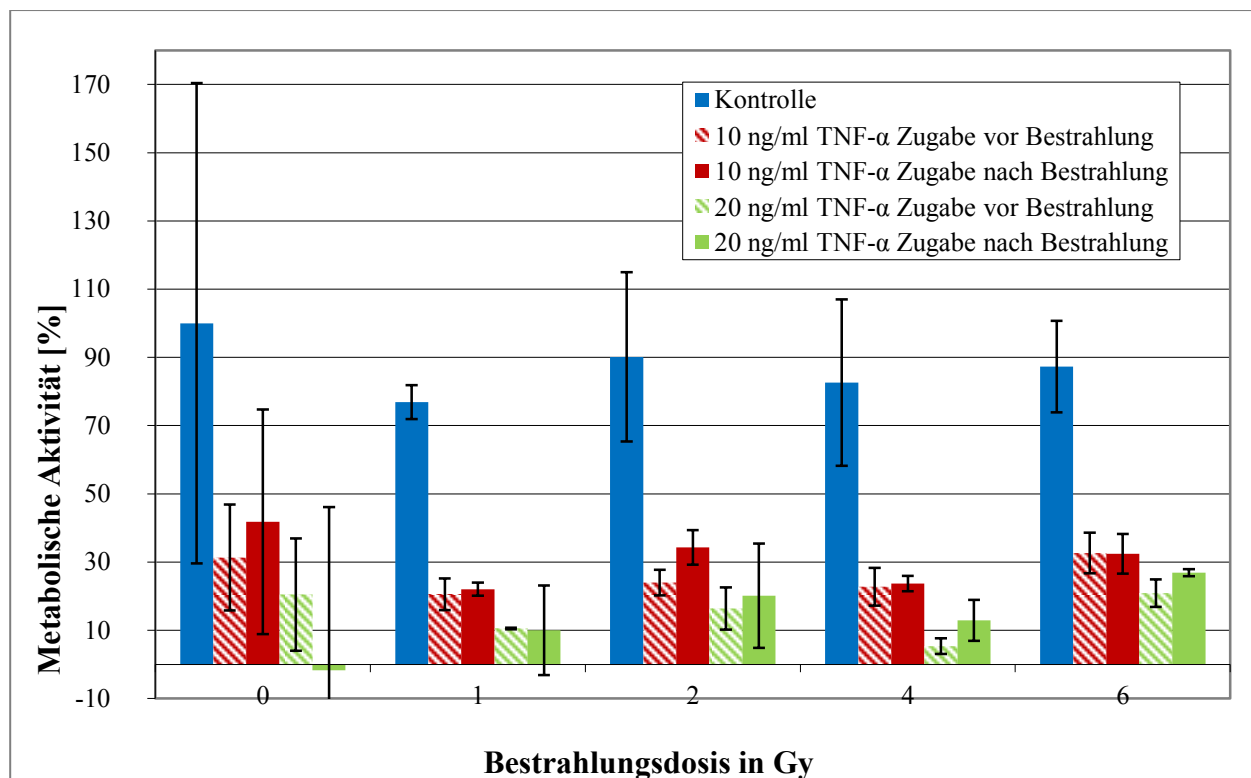


Abb. 24: Metabolische Aktivität der ohne Serum inkubierten H5V-Zellen 24 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger bei Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α vor oder nach der Bestrahlung. Dargestellt sind MW \pm SD (n=2), normiert auf die unbestrahlte Probe ohne Zugabe von TNF- α .

Nachdem in den Versuchen mit serumhaltigem, hitzeinaktiviertem Medium kein Effekt beobachtet werden konnte, war nun zu sehen, dass mit serumfreiem Medium 24 h nach Bestrahlung (Abb. 24) ein deutlich erkennbarer Effekt von TNF- α auf die metabolische Aktivität der H5V-Zellen beobachtet werden konnte. So war die metabolische Aktivität für die nativen Kontrollen deutlich höher als bei den Proben unter Einfluss von TNF- α . Dieser Effekt zeigte sich bei allen Bestrahlungsdosen. Weiterhin lag die metabolische Aktivität bei Zugabe der höheren Dosis von 20 ng/ml TNF- α stets niedriger als bei Zugabe der niedrigeren Dosis von 10 ng/ml TNF- α . Die Werte für die optischen Dichten und den daraus errechneten metabolischen Aktivitäten der mit 5×10^3 Zellen pro Well inkubierten Proben waren nur geringfügig höher als die des zellfreien Mediums. Der Wert für 0 Gy und 20 ng/ml TNF- α lag sogar unter dem Wert des zellfreien Mediums (negativer Wert in Abb. 24). Folglich wurde auch dieser Versuch kein drittes Mal durchgeführt, sondern die Einsaatdichte auf 5×10^4 Zellen pro Well für die nächsten Versuche erhöht. In den folgenden Abbildungen ist die metabolische Aktivität der H5V-Zellen 1 h (Abb. 20) sowie 24 h nach Bestrahlung (Abb. 21) dargestellt.

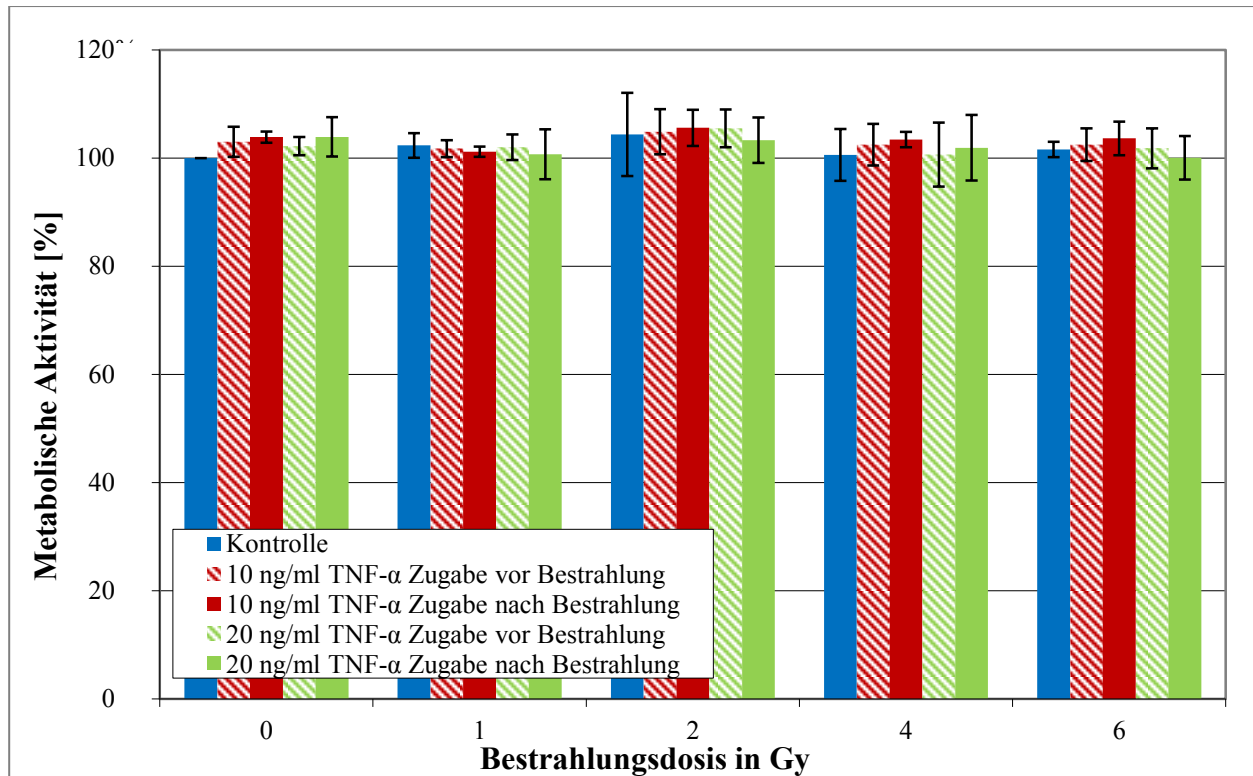


Abb. 25: Metabolische Aktivität der ohne Serum inkubierten H5V-Zellen 1 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger bei Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α vor oder nach der Bestrahlung. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3), normiert auf die unbestrahlte Probe ohne Zugabe von TNF- α .

1 h nach Bestrahlung (Abb. 25) zeigten sich keine signifikanten Effekte. Sowohl die unterschiedlichen Bestrahlungsdosen und unterschiedlichen TNF- α -Konzentrationen scheinen sich 1 h nach Bestrahlung nicht auf die metabolische Aktivität der H5V-Zellen auszuwirken. Minimale Abweichungen waren am ehesten zufällig bedingt. Durch die höhere Einsaatdichte von 5×10^4 Zellen pro Well konnte die Standardabweichung deutlich reduziert werden.

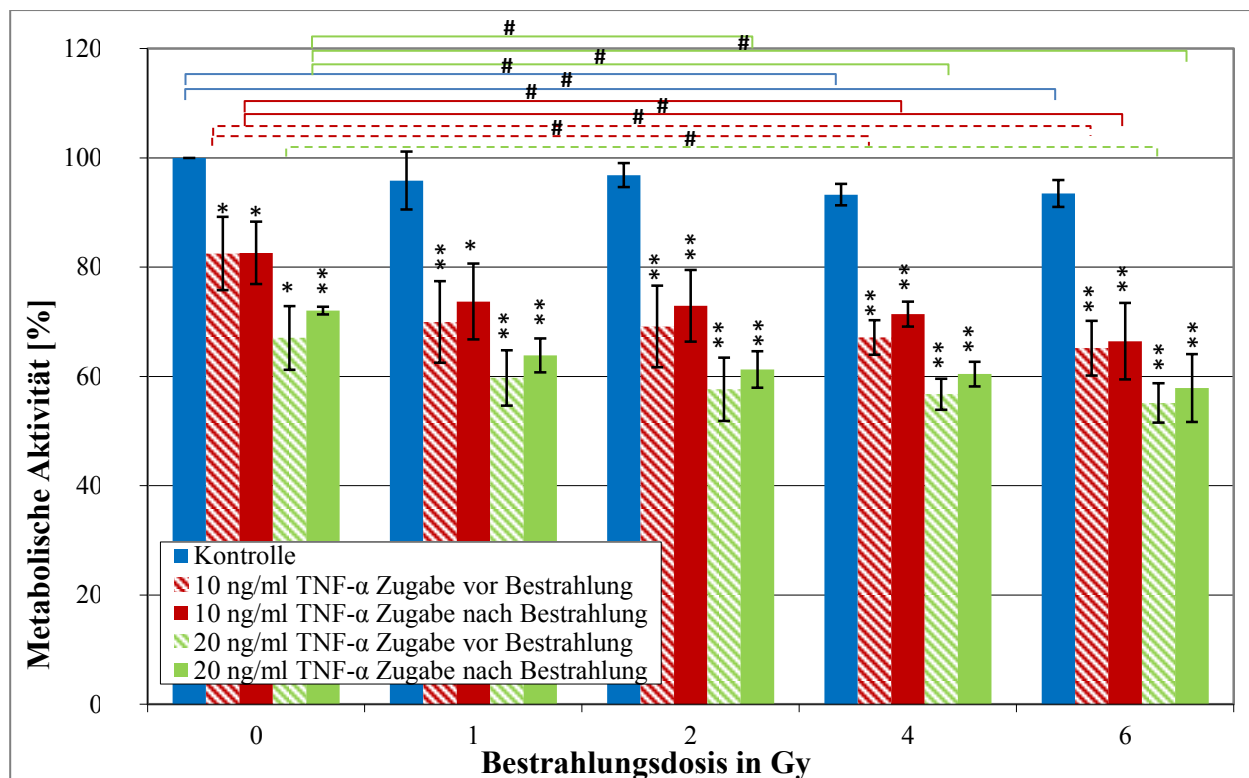


Abb. 26: Metabolische Aktivität der ohne Serum inkubierten H5V-Zellen 24 h nach einmaliger Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger bei Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α vor oder nach der Bestrahlung. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3), normiert auf die unbestrahlte Probe ohne Zugabe von TNF- α . Sofern nicht anderweitig gekennzeichnet: * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ bezogen auf die unbehandelten Werte (blaue Balken) derselben Bestrahlungsdosis; # = $p \leq 0,05$ bezogen auf die unbestrahlte Probe (0 Gy) desselben Ansatzes.

Durch die auf 5×10^4 Zellen pro Well erhöhte Einsaatdichte konnte der bereits bei der geringeren Einsaatdichte beobachtete Effekt von TNF- α (Abb. 24) bei ausreichend hohen Werten der optischen Dichte reproduziert werden. So zeigte sich 24 h nach Bestrahlung (Abb. 26) eine für alle Werte signifikante, konzentrationsabhängige Hemmung der metabolischen Aktivität der H5V-Zellen. Wenn TNF- α vor der Bestrahlung zugegeben wurde, war der Effekt für alle Werte geringfügig stärker ausgeprägt. Eine zunehmende Bestrahlungsdosis ab 1 Gy führte tendenziell zu etwas niedrigeren Werten der metabolischen Aktivität. Diese Abnahme war ab einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy für alle Werte bis auf den Wert für den Ansatz 20 ng/ml TNF- α vor Bestrahlung signifikant.

3.3 Klonogenes Überleben

Koloniebildungstests sind eine etablierte Methode um die Strahlensensibilität von Zellen zu untersuchen. Darüber hinaus sollte die Wirkung von $\text{TNF-}\alpha$ auf das klonogene Überleben der H5V-Zellen bestimmt werden. 24 h nach Einsaat in 6-Wellplatten wurden die Zellen entweder mit dem Linearbeschleuniger oder mit dem Röntgentherapiegerät bestrahlt. 7 Tage nach Bestrahlung wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und nach weiteren 3 Tagen die Plattiereffizienz (gebildete Koloniezahl/ingesäte Zellzahl) ermittelt, wobei Kolonien ab einer Zellzahl von 50 gezählt wurden. Zunächst wurden in einem Vorversuch unterschiedliche Einsaatdichten getestet. In Abb. 27 sind die Einsaatdichten von 1×10^2 , 2×10^2 und 4×10^2 nach Bestrahlung mit 6 Gy oder als Kontrolle ohne Bestrahlung dargestellt.

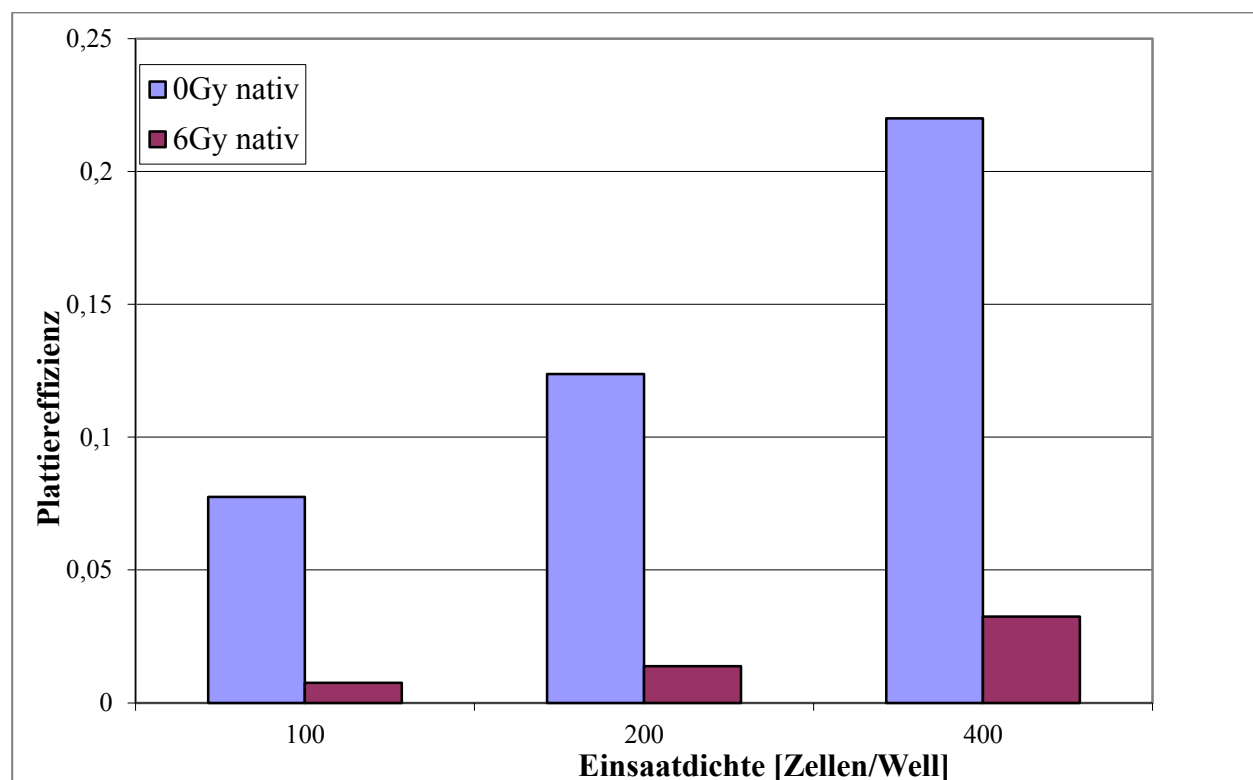


Abb. 27: Koloniezahl der H5V-Zellen bei unterschiedlichen Einsaatdichten. Dargestellt sind die Mittelwerte der Plattiereffizienz aus jeweils 2 Wells eines Experimentes ($n=1$).

Bei einer Einsaatdichte von 400 Zellen/Well war es noch möglich die einzelnen Kolonien bei 0 Gy separat zu zählen, gleichzeitig waren bei Bestrahlung mit 6 Gy durch den Linearbeschleuniger noch ausreichend Kolonien vorhanden, um den Versuch statistisch sinnvoll auszuwerten. Für die folgenden Versuche wurde je 400 Zellen pro Well in 6-Wellplatten eingesät. Analog zum EZ4U-

Test wurde dieser Versuch einmal mit hitzeinaktiviertem Serum (Abb. 28) im Medium durchgeführt und anschließend in einer Modifikation des Versuchsprotokolls das Serum entzogen (Abb. 29).

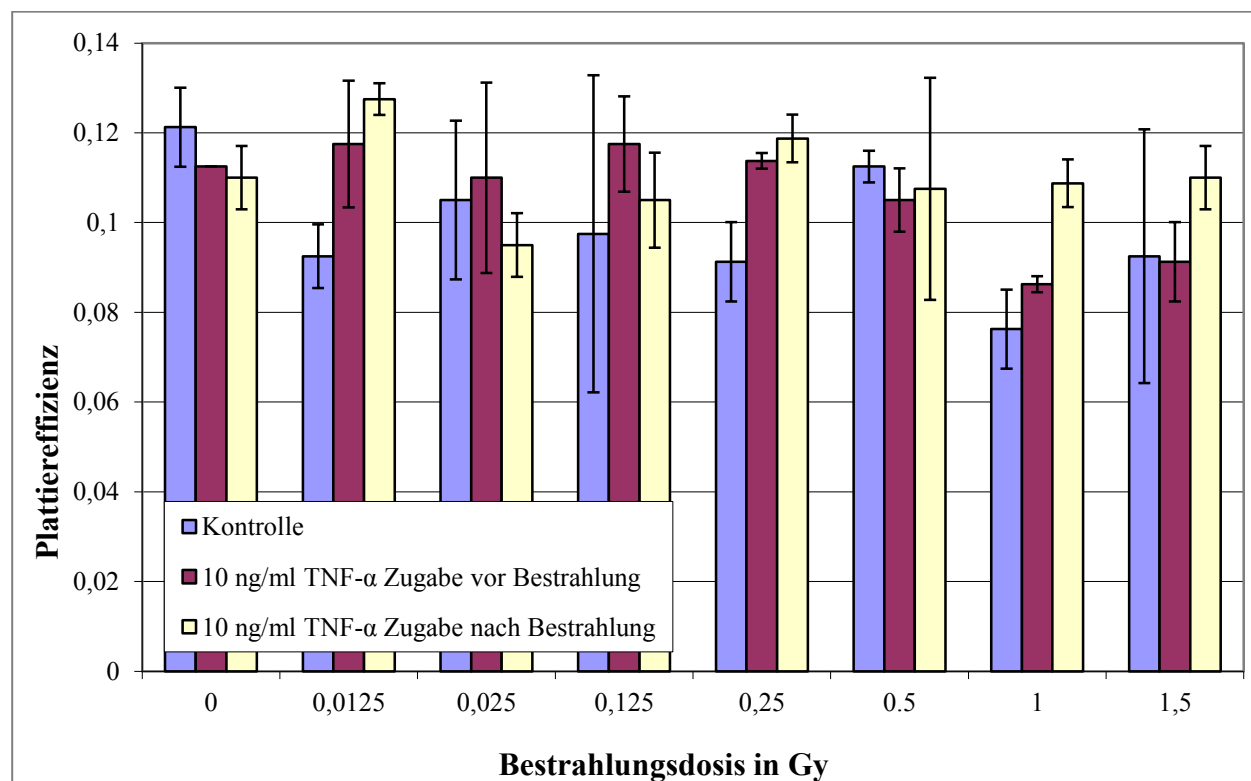


Abb. 28: Platiereffizienz der in serumhaltigem Medium inkubierten H5V-Zellen bei Zugabe von 10 ng/ml TNF- α vor oder nach der Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät. Dargestellt sind die Mittelwerte der Platiereffizienz aus jeweils 2 Wells eines Experimentes (n=1).

Es zeigte sich bei dem Versuch mit Serum bei zunehmender Bestrahlungsdosis eine geringfügige Abnahme des klonogenen Überlebens (Abb. 28). Ein Einfluss von TNF- α konnte nicht ermittelt werden. Die Platiereffizienzen entsprachen Koloniezahlen von 37 – 45 pro Well.

Bei den Versuchen ohne Serum konnte keine Koloniebildung beobachtet werden. Da dies auf eine starke Abhängigkeit der H5V-Zellen vom Serum hindeutet, wurde das Versuchsprotokoll modifiziert. Dazu wurde 24 h vor Bestrahlung ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium durchgeführt, nach weiteren 24 h wurde das serumfreie Medium wieder durch serumhaltiges Medium ersetzt. So konnte sichergestellt werden, dass mögliche Effekte auf die H5V-Zellen während der kritischen Phase (Bestrahlung und Zugabe von TNF- α) nicht durch Serum verhindert werden und andererseits anschließend wieder eine Proliferation möglich ist, um ausreichend große Kolonien zu bilden. Dieser Versuch wurde dann am Röntgentherapiegerät mit Einzeldosen von 0 – 1,5 Gy (Abb. 29) und fraktioniert (4 x) mit Gesamtdosen von 0 – 6 Gy durchgeführt (Abb. 30).

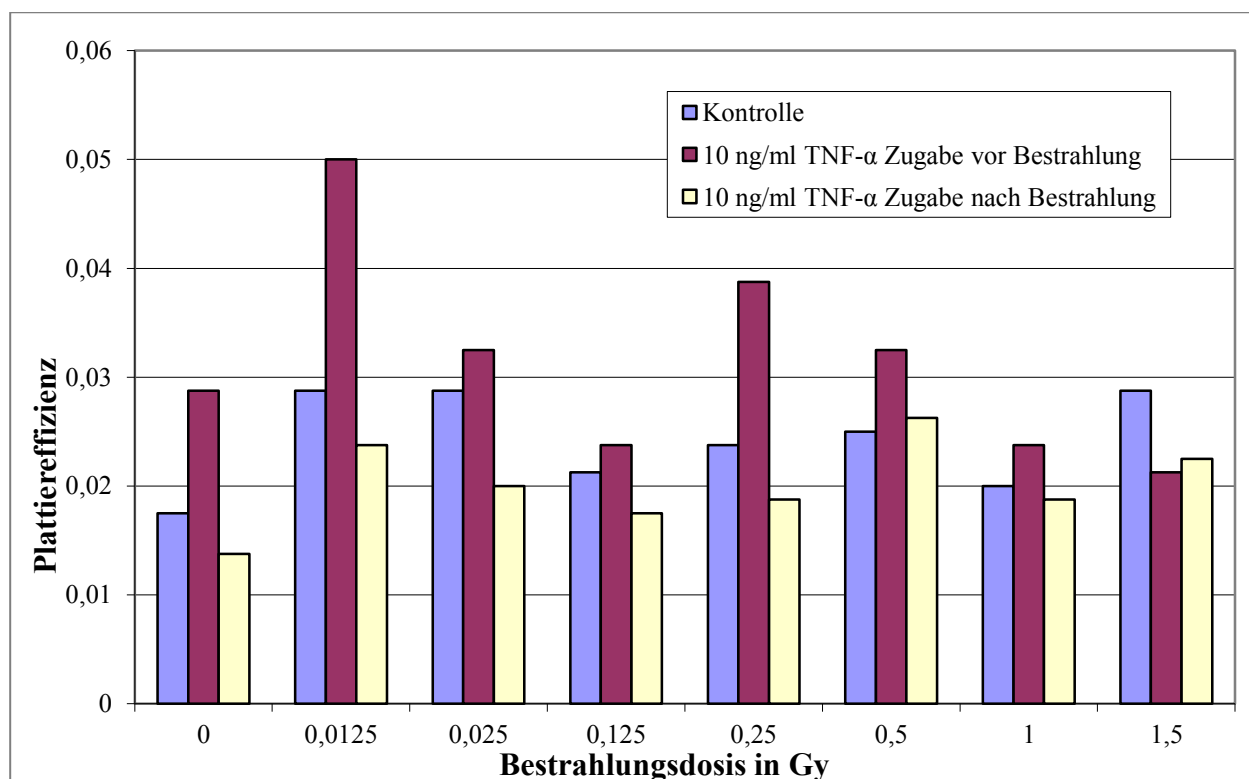


Abb. 29: Plattenreffizienz der temporär ohne Serum kultivierten H5V-Zellen bei Zugabe von 10 ng/ml TNF- α vor oder nach Bestrahlung. Dargestellt sind die Mittelwerte der Plattenreffizienz aus jeweils 2 Wells eines Experimentes (n=1).

Bei den Einzeldosen (Abb. 29) waren lediglich Koloniezahlen von 7 – 12 Kolonien pro Well vorhanden. Es zeigte sich lediglich eine leichte Abnahme der Plattenreffizienz bei Zugaben von TNF- α nach Bestrahlung. Im Vergleich zu dem Versuch, in dem die H5V-Zellen durchgehend mit Serum versorgt waren (Abb. 28), zeigt sich ein deutlicher Abfall auf etwa nur noch ein Viertel der ursprünglichen Plattenreffizienz. Wurde das TNF- α hingegen vor der Bestrahlung hinzugefügt, führte dies zu einer Erhöhung der Plattenreffizienz. Dies war am deutlichsten bei der Bestrahlung mit der niedrigsten Dosis von 0,0125 Gy ausgeprägt. Dagegen kam es bei der höchsten Bestrahlungsdosis von 1,5 Gy zu einer Abnahme der Plattenreffizienz bei Gabe vor Bestrahlung.

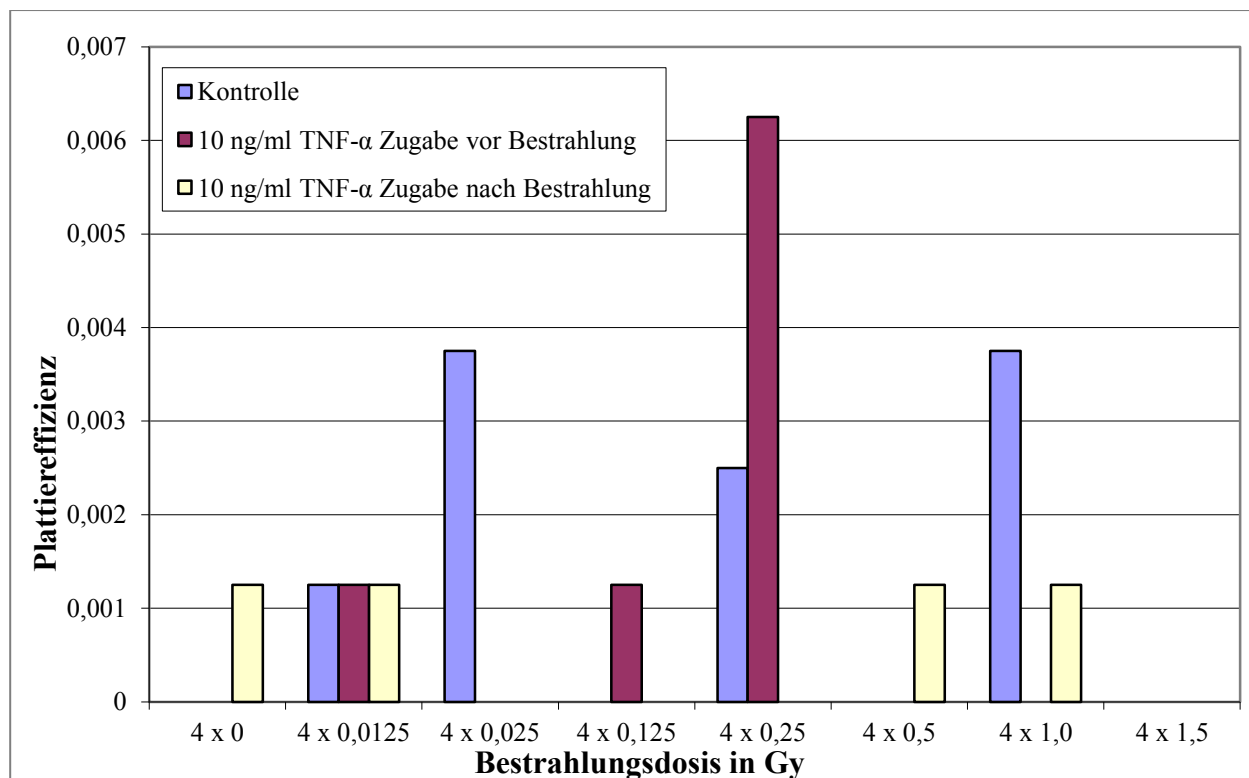


Abb. 30: Platteeffizienz der temporär ohne Serum kultivierten H5V-Zellen bei Zugabe von 10 ng/ml TNF- α vor oder nach fraktionierter (4 X) Bestrahlung. Dargestellt sind die Mittelwerte der Platteeffizienz aus jeweils 2 Wells eines Experimentes (n=1).

Bei den Versuchen mit fraktionierter Bestrahlung (Abb. 30) lag die Platteeffizienz noch deutlich niedriger als bei den Versuchen mit Bestrahlung von Einzeldosen und entsprach nur noch Koloniezahlen von 0-3 Kolonien pro Well. Unter diesen Bedingungen konnte somit keine aussagekräftige Auswertung stattfinden. Als Ursache wurde die um 24 h verlängerte Zeit in serumfreiem Medium vermutet. Diese entsteht dadurch, dass die fraktionierte Bestrahlung im Gegensatz zur Bestrahlung mit Einzeldosen, auf 4 Fraktionen verteilt über 24 h stattfindet. Der Wechsel von serumfreiem auf serumhaltiges Medium erfolgte 24 h nach Bestrahlung. Somit resultiert bei fraktionierter Bestrahlung eine Zeit von 72 h in serumfreien Medium im Gegensatz zu 48 h bei den Versuchen mit Bestrahlung von Einzeldosen. Folglich wurde geplant in einem weiteren Schritt die Einsaatdichte zu erhöhen, um eine ausreichende Koloniezahl pro Well zu erreichen.

Für alle folgenden Versuche wurde das Protokoll (Einsaat 48 h vor Bestrahlung (mit serumhaltigem Medium) 24 h vor Bestrahlung Mediumwechsel auf serumfreies Medium sowie Wechsel 24 h nach Bestrahlung zurück auf serumhaltiges Medium) beibehalten und die Einsaatdichte von 4×10^2 auf 4×10^3 Zellen pro Well erhöht. Diese Versuche wurden für Einzeldosen von 0 – 1,5 Gy (Abb. 31) sowie Gesamtdosen von 0 – 6 Gy bei fraktionierter Bestrahlung (Abb. 32) am Röntgentherapiegerät

durchgeführt. Am Linearbeschleuniger wurden ebenfalls Bestrahlungsdosen von 0 – 6 Gy untersucht (Abb. 33).

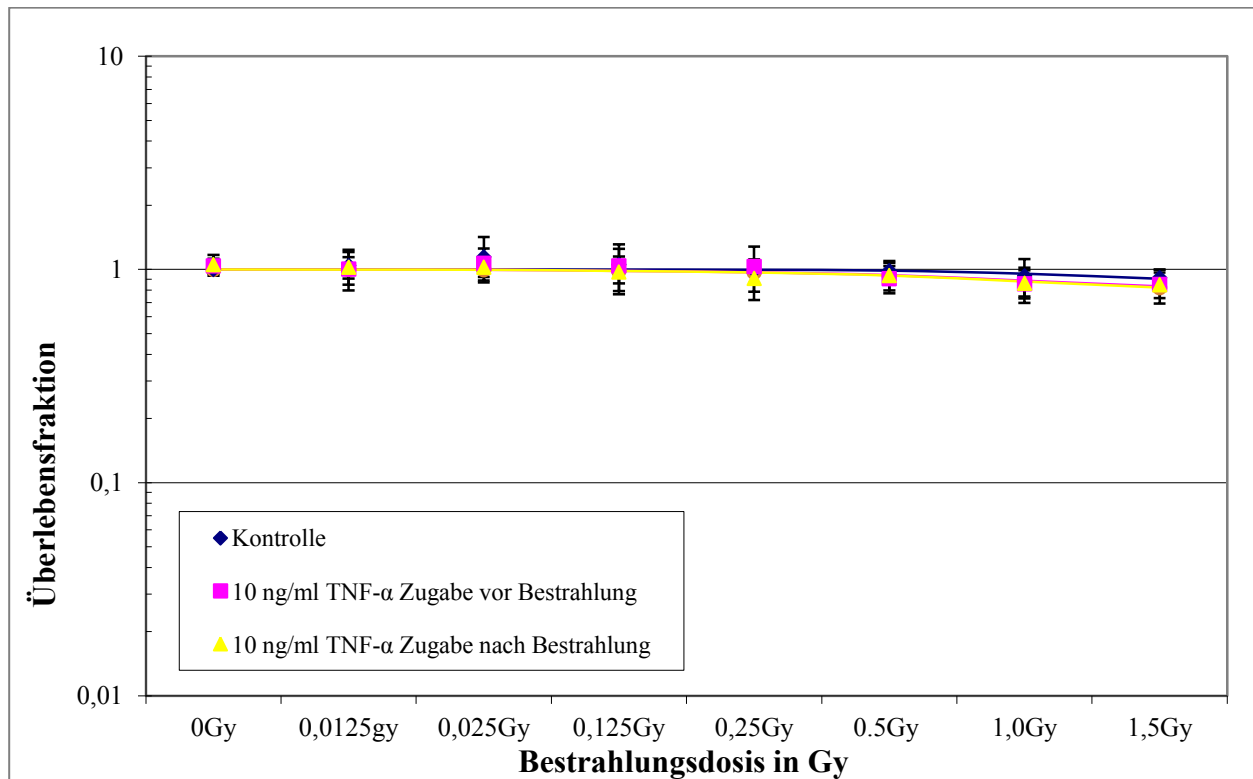


Abb. 31: Koloniebildungsfähigkeit der temporär ohne Serum inkubierten HSV-Zellen bei Zugabe von 10 ng/ml TNF- α vor oder nach Bestrahlung mit Einzeldosen am Röntgentherapiegerät. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3), normiert auf die unbestrahlte Probe ohne Zugabe von TNF- α .

Die Koloniezahl bei Bestrahlungsdosen bis zu 1,5 Gy (Abb. 31) zeigte keine signifikanten Unterschiede zur unbestrahlten Kontrolle. Ein Einfluss der Zugabe von TNF- α auf die Anzahl der gebildeten Kolonien konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.

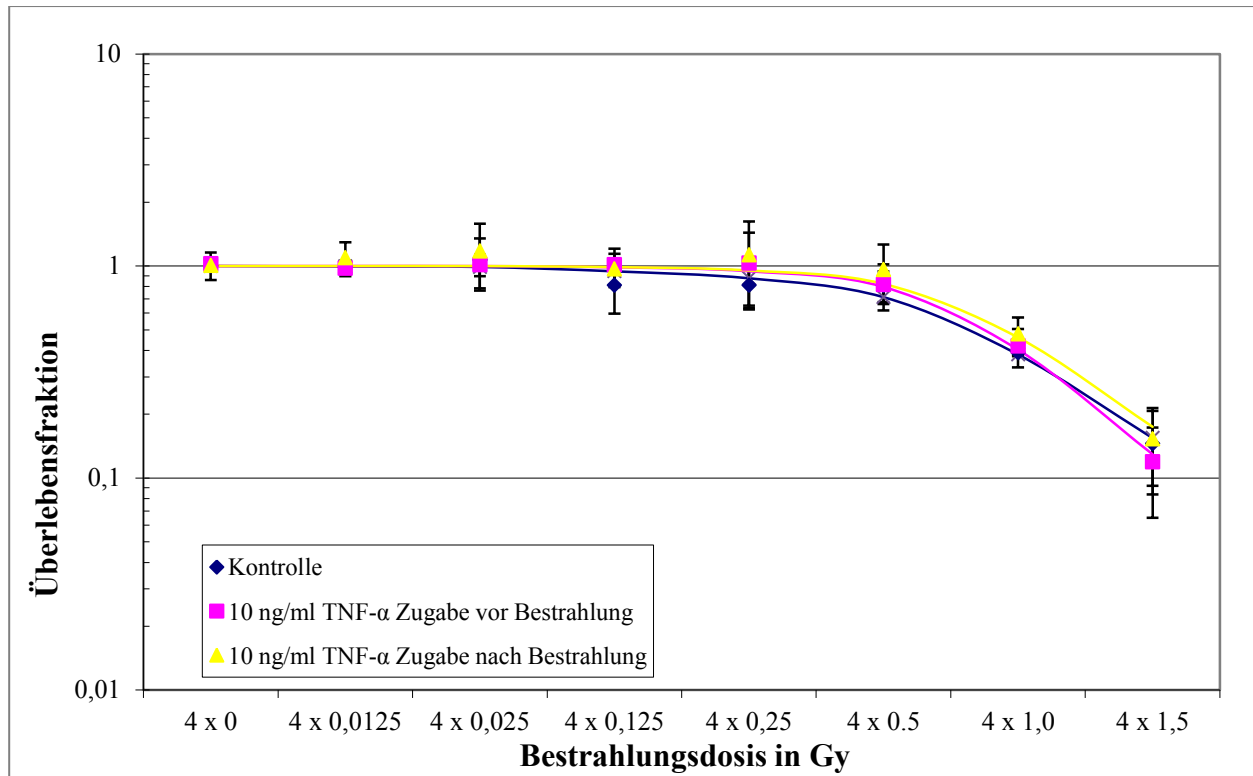


Abb. 32: Fitkurve nach dem Linear-Quadratischen-Modell für die Koloniebildungsfähigkeit der temporär ohne Serum inkubierten H5V-Zellen bei Zugabe von 10 ng/ml TNF- α vor oder nach fraktionierter Bestrahlung am Röntgentherapiegerät. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3), normiert auf die unbestrahlte Probe ohne Zugabe von TNF- α .

Bei der fraktionierten Bestrahlung (4 x) zeigte sich unabhängig von der Zugabe von TNF- α eine signifikante Abnahme der Überlebensfraktion ab einer Gesamtdosis von 4 Gy (4 x 1 Gy). Eine Gesamtdosis von 4 Gy führte zu einer Abnahme der Koloniezahl auf ca. 39 % – 48 %. Nach Bestrahlung mit 6 Gy (4 x 1,5 Gy) lag die Überlebensfraktion lediglich bei ca. 12 % - 15 %. Bestrahlungsdosen bis 2 Gy (4 x 0,5 Gy) hatten hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der H5V-Zellen.

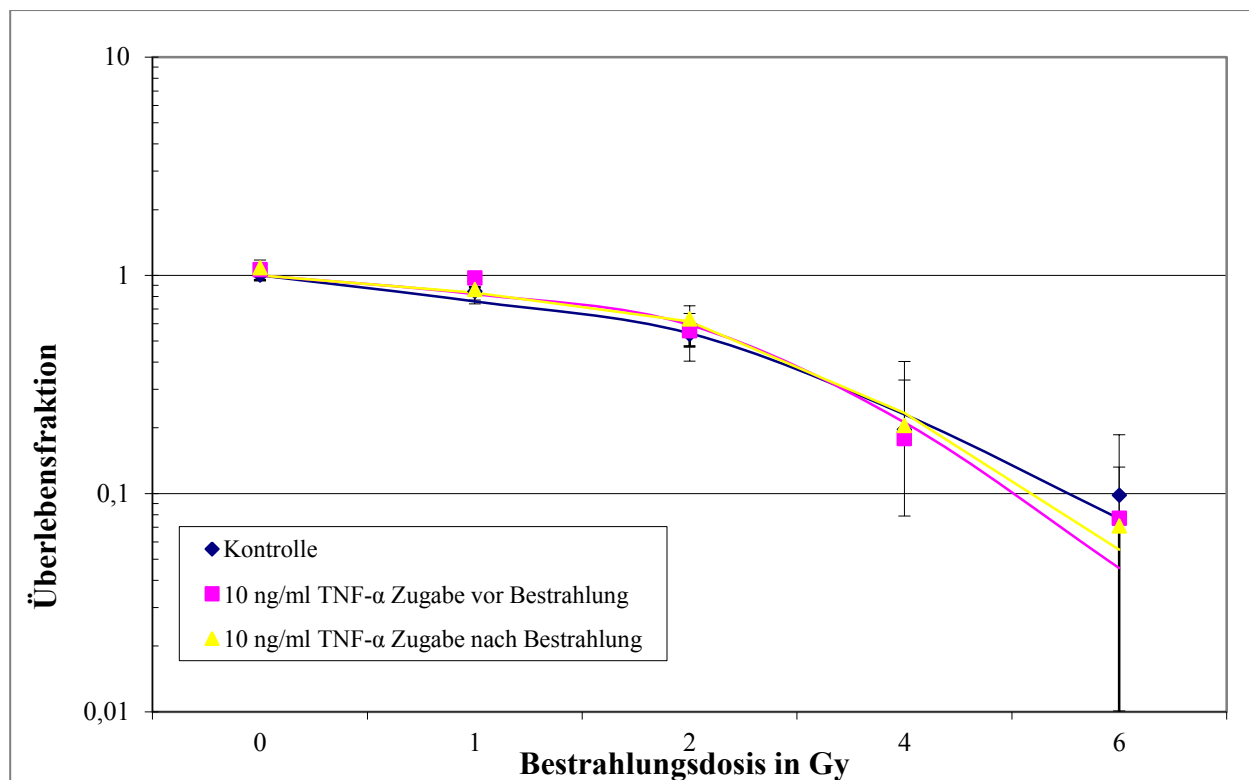


Abb. 33: Fitkurve nach dem dem Linear-Quadratischen-Modell für die Koloniebildungsfähigkeit der temporär ohne Serum inkubierten H5V-Zellen bei Zugabe von 10 ng/ml TNF- α vor oder nach Bestrahlung am Linearbeschleuniger. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3), normiert auf die unbestrahlte Probe ohne Zugabe von TNF- α .

Bei der Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger (Abb. 33) zeigte sich bereits ab einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy eine signifikante Abnahme der Überlebensfraktion auf ca. 54 % - 63 %. Bestrahlungsdosen von 4 Gy bzw. 6 Gy führten zu einer Abnahme der Überlebensfraktion auf 18 % - 20 % bzw. 7 % - 10 %. Die Zugabe von TNF- α vor oder nach Bestrahlung führte zu keinen signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrolle.

3.4 Bestimmung der TGF- β_1 -Konzentration

Mit Hilfe des TGF- β_1 Immunoassays konnte die TGF- β_1 -Konzentration im Zellüberstand fotometrisch bestimmt werden. In den Versuchen wurde die relative TGF- β_1 -Konzentration im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle ohne Zugabe von TNF- α bestimmt. Da das für die bisherigen Versuche verwendete Bestrahlungsgerät durch ein neues ersetzt wurde und durch die Nutzung eines Messingkeils mehrere Dosen gleichzeitig untersucht werden konnten, wurden für die Versuche zur Bestimmung der TGF- β_1 -Konzentration andere Bestrahlungsdosen als bisher verwendet. Durch die Verwendung dieses Messingkeils war es nicht möglich die Bestrahlungsdosen für alle Wells frei zu wählen, wodurch sich die Nachkommastellen erklären. Da sich in den vorherigen Versuchen gezeigt

hatte, dass die Wirkung von $\text{TNF-}\alpha$ nach 24 h Inkubationszeit eindeutig nachweisbar war, bei einer Inkubationszeit von 1 h jedoch kein Effekt beobachtet werden konnte, wurde die Inkubationszeit nach Bestrahlung zur Bestimmung der $\text{TGF-}\beta_1$ -Freisetzung auf 4 h oder 24 h festgelegt. Dieser Versuch wurde mit Einzeldosen am Röntgentherapiegerät (Abb. 34, Abb. 35) sowie am Linearbeschleuniger (Abb. 36, Abb.37) durchgeführt.

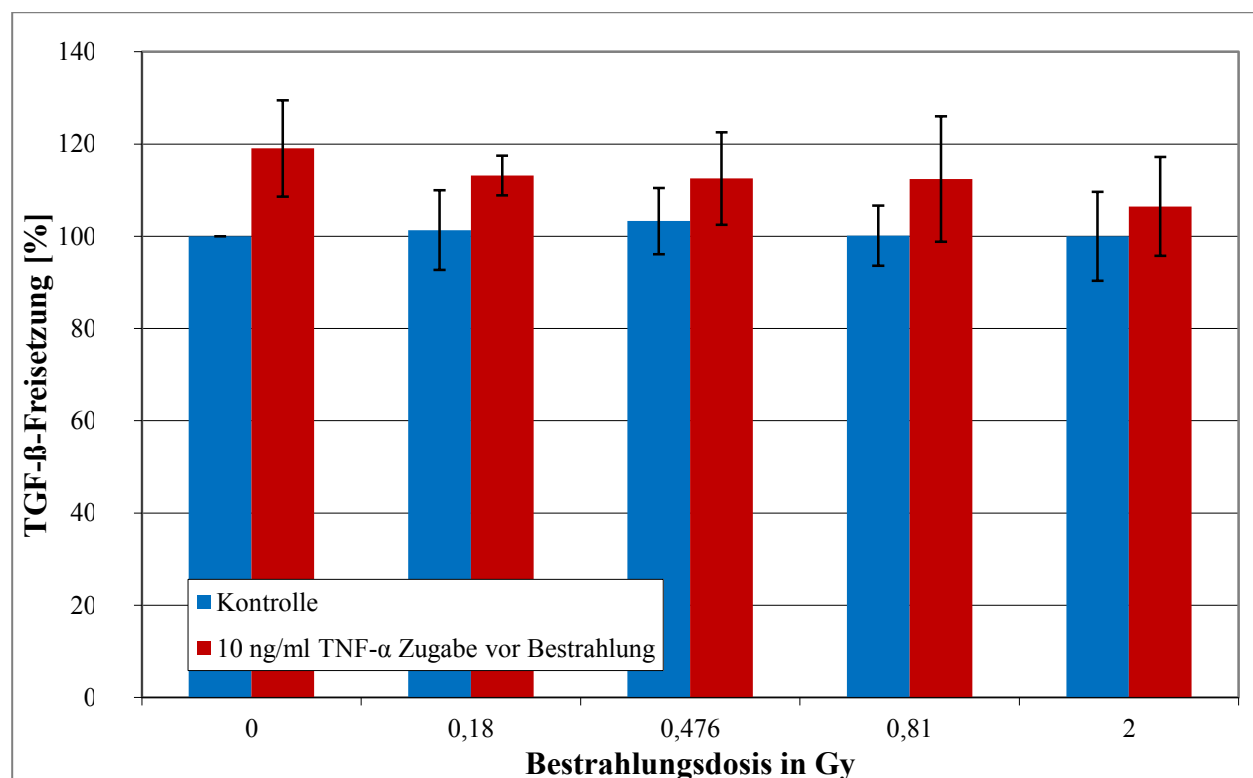


Abb. 34: Relative $\text{TGF-}\beta_1$ -Konzentration im Überstand der H5V-Zellen bei Zugabe von 10 ng/ml $\text{TNF-}\alpha$ vor der Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät. Die Inkubationszeit nach Bestrahlung betrug 4 h. Dargestellt sind $\text{MW} \pm \text{SD}$ ($n=3$), normiert auf die unbestrahlte Probe ohne Zugabe von $\text{TNF-}\alpha$.

Bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 4 h nach Bestrahlung (Abb. 34) zeigte sich in allen Proben, zu denen vorher $\text{TNF-}\alpha$ in einer Konzentration von 10 ng/ml hinzugefügt worden war, eine nicht signifikant erhöhte Konzentration von $\text{TGF-}\beta_1$. Dieser Effekt war mit einer Erhöhung der $\text{TGF-}\beta_1$ -Konzentration um fast 20 % in der unbestrahlten Kontrolle am deutlichsten ausgeprägt. Es zeigte sich die Tendenz, dass sich in den mit $\text{TNF-}\alpha$ stimulierten Proben mit zunehmender Bestrahlungsdosis eine geringfügig niedrigere Konzentration von $\text{TGF-}\beta_1$ nachweisen lies, während bei den nichtstimulierten Kontrollen die Bestrahlungsdosis keinen Einfluss auf die $\text{TGF-}\beta_1$ -Freisetzung hatte.

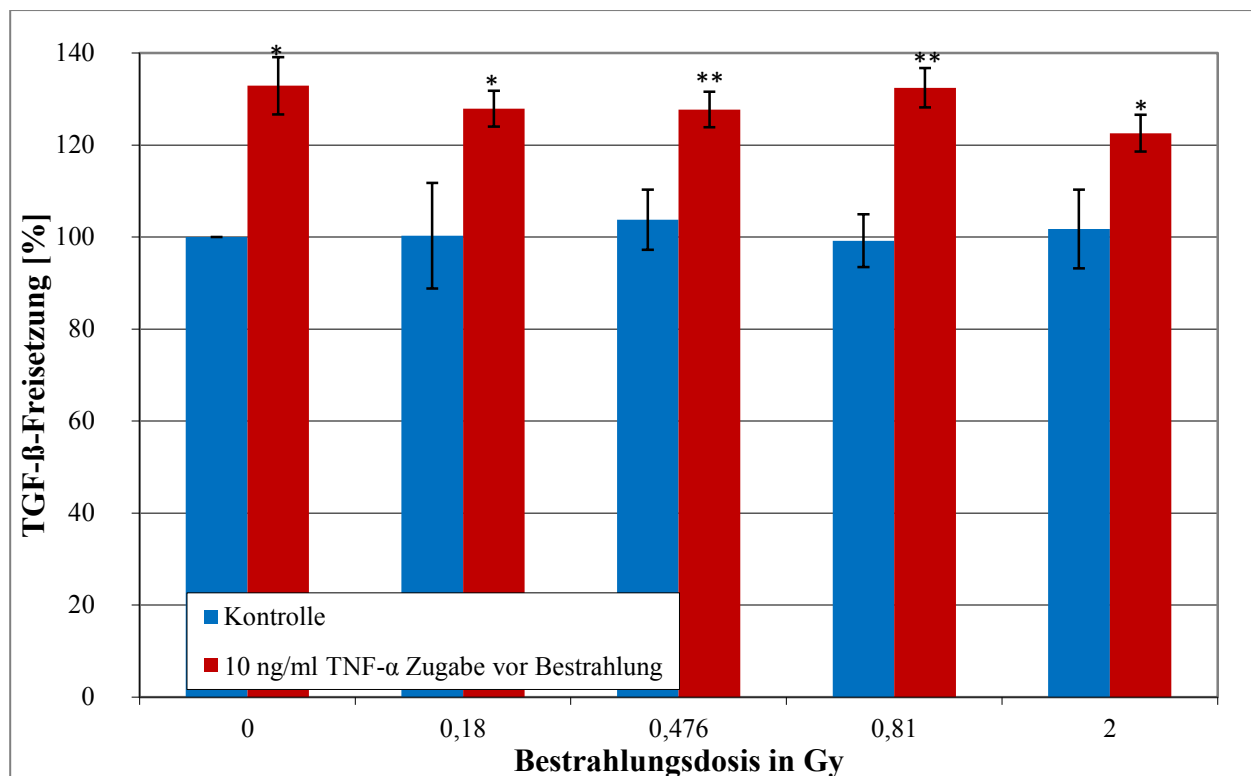


Abb. 35: Relative TGF- β_1 -Konzentration im Überstand der H5V-Zellen bei Zugabe von 10 ng/ml TNF- α vor der Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät. Die Inkubationszeit nach Bestrahlung betrug 24 h. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3), normiert auf die unbestrahlte Probe ohne Zugabe von TNF- α . $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$ bezogen auf die Werte der ohne TNF- α behandelten Ansätze (blaue Balken) derselben Bestrahlungsdosis.

Bei einer Analyse 24 h nach Bestrahlung (Abb. 35) stellte sich die Erhöhung der TGF- β_1 -Konzentration in den Proben, denen TNF- α in einer Konzentration von 10 ng/ml hinzugefügt worden war, noch deutlicher und signifikant dar. Die Werte lagen zum Teil fast 35 % höher als der entsprechende Wert ohne Zugabe von TNF- α (Werte für 0 Gy und 0,81 Gy). Für die Ansätze mit Zugabe von TNF- α zeigte sich eine geringfügige Abnahme der TGF- β_1 -Konzentration mit zunehmender Bestrahlungsdosis. Dies galt nicht für den Wert mit einer Bestrahlungsdosis von 0,81 Gy. Ansonsten war kein Einfluss der Bestrahlung auf die TGF- β_1 -Sekretion zu erkennen.

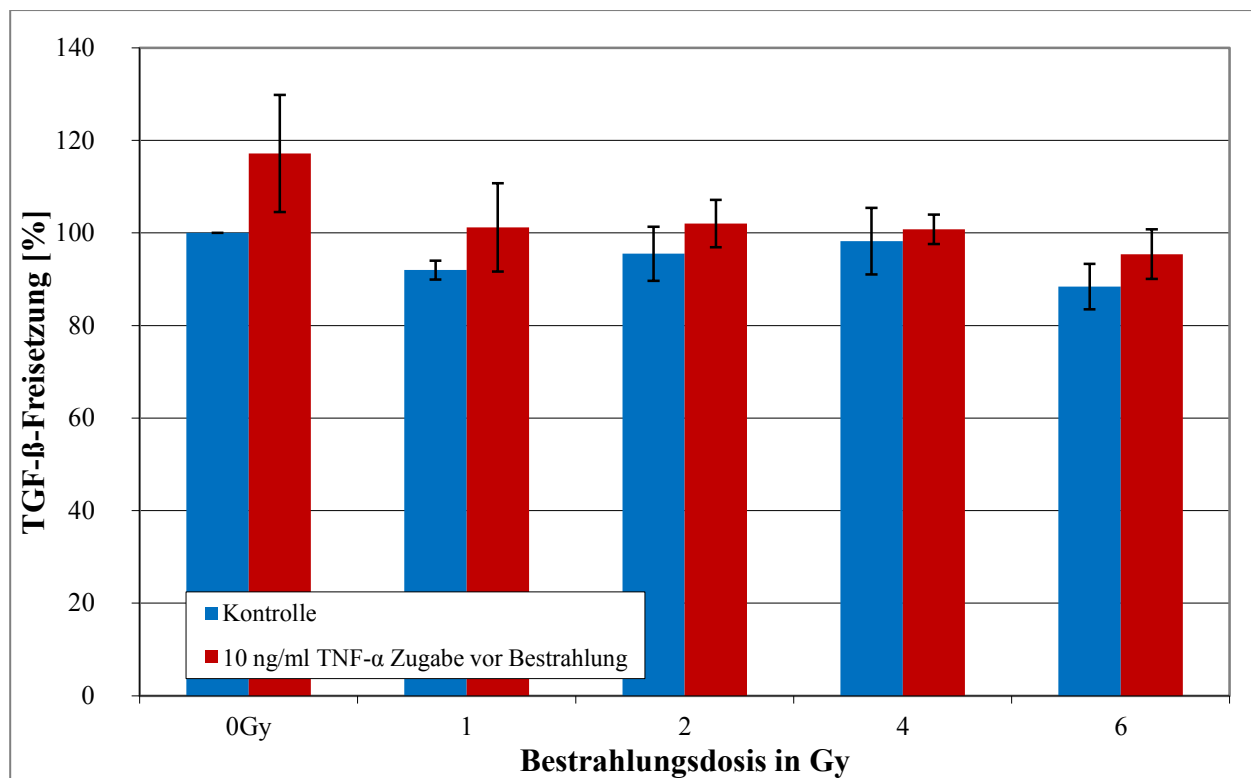


Abb. 36: Relative TGF- β_1 -Konzentration im Überstand der H5V-Zellen bei Zugabe von 10 ng/ml TNF- α vor der Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger. Die Inkubationszeit nach Bestrahlung betrug 4 h. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3), normiert auf die unbestrahlte Probe ohne Zugabe von TNF- α .

4 h nach der Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger (Abb. 36) zeigte sich wiederum eine Zunahme der TGF- β_1 -Konzentration in den mit TNF- α stimulierten Proben. Am ausgeprägtesten war dieser Effekt in der unbestrahlten Kontrolle. In den anderen Proben zeigten sich zum Teil nur minimale Änderungen, jedoch lag der Mittelwert der mit TNF- α stimulierten Zellen immer über dem der nicht stimulierten Zellen. Tendenziell führten höhere Bestrahlungsdosen zu einer verringerten TGF- β_1 -Freisetzung. Die maximalen TGF- β_1 -Konzentrationen wurden sowohl bei den mit TNF- α stimulierten als auch bei den nicht stimulierten Ansätzen bei der unbestrahlten Kontrolle gemessen. Bei der maximalen Bestrahlungsdosis von 6 Gy waren hingegen sowohl der Wert mit als auch derjenige ohne Zugabe von TNF- α am niedrigsten. Für die Bestrahlungsdosen 1, 2 und 4 Gy zeigte sich keine Dosisabhängigkeit der TGF- β_1 -Freisetzung.

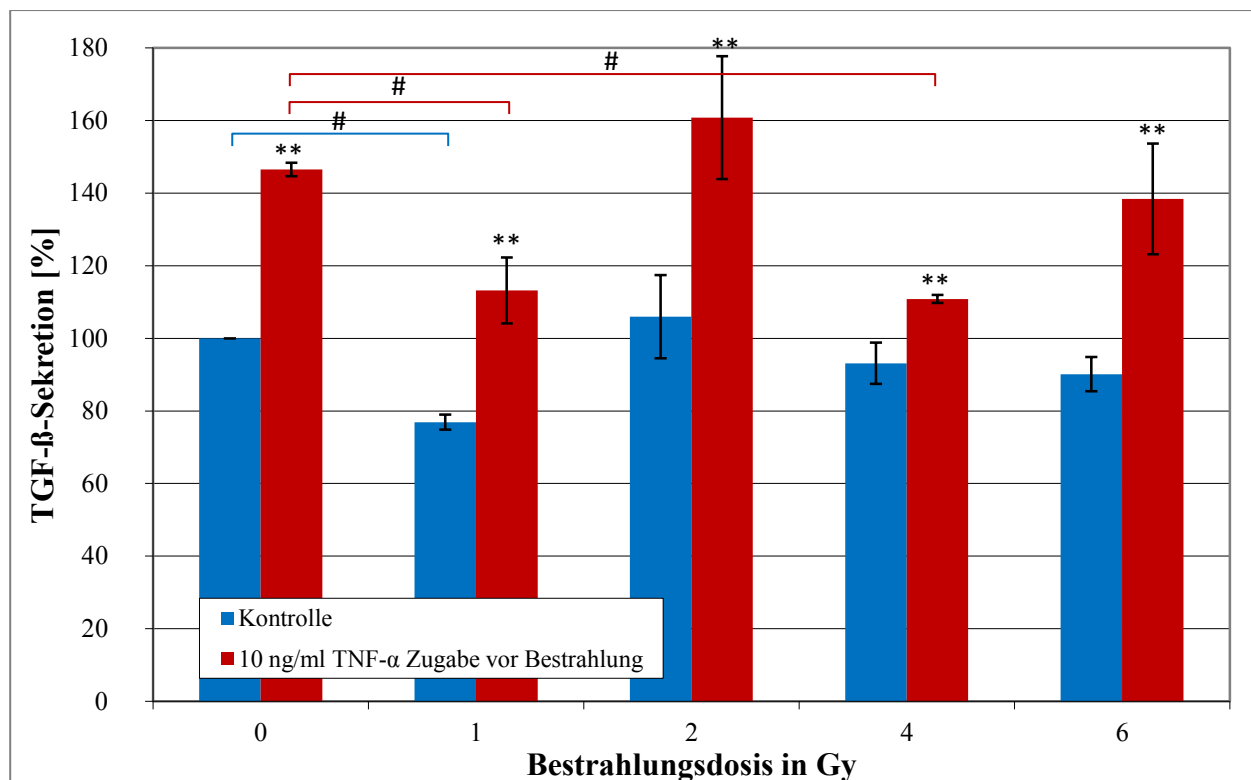


Abb. 37: Relative TGF- β_1 -Konzentration im Überstand der H5V-Zellen bei Zugabe von 10 ng/ml TNF- α vor der Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger. Die Inkubationszeit nach Bestrahlung betrug 24 h. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3), normiert auf die unbestrahlte Probe ohne Zugabe von TNF- α . Sofern nicht anderweitig gekennzeichnet: $p \leq 0,05$ = *; $p \leq 0,01$ = ** bezogen auf die Werte der ohne TNF- α behandelten Ansätze (blaue Balken) derselben Bestrahlungsdosis; # = $p \leq 0,05$ bezogen auf die unbestrahlte Probe (0 Gy) desselben Ansatzes

24 h nach der Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger (Abb. 37) zeigte sich in den Proben zu denen TNF- α in einer Konzentration von 10 ng/ml hinzugefügt wurde, eine Zunahme der TGF- β_1 -Freisetzung um ca. 20-50 %, wobei bei einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy ein Maximum auftrat. Ob es sich hierbei um eine zufällige Schwankung oder einen Effekt der Bestrahlung handelt, bleibt ungewiss. Bei den Sekretionsraten unter den Bestrahlungsdosen von 1 Gy und 4 Gy zeigten sich sowohl bei den durch TNF- α -stimulierten als auch bei den nicht stimulierten Zellen signifikant niedrigere Werte als bei der unbestrahlten Kontrolle.

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Wirkung niedrig dosierter fraktionierter und nicht fraktionierter Strahlung auf die metabolische Aktivität, das klonogene Überleben und die TGF- β_1 -Freisetzung von murinen Endothelzellen der Zelllinie H5V untersucht und mit der der hoch dosierten Strahlung verglichen werden. In diesem Zusammenhang wurde zudem der Einfluss einer Stimulation mit TNF- α vor oder nach der Bestrahlung getestet.

4.1 Wachstumskurven

Die Zellpopulationsverdopplungszeiten der H5V-Zellen wurden für alle Einsaatdichten zwischen Tag 1 und Tag 2 berechnet. Sie betrugen 39,6 h bei einer Einsaatdichte von 1×10^3 , 14,9 h bei einer Einsaatdichte von 1×10^4 und 13,1 h bei einer Einsaatdichte von 2×10^4 Zellen pro Well. Für die Einsaatdichte von 1×10^3 Zellen erwies sich die Wachstumskurve als sehr schwankungsanfällig, was sich in Form der hohen Standardabweichung und des untypischen Kurvenverlaufes bemerkbar machte. Die höchste Einsaatdichte von 2×10^4 Zellen lieferte hingegen die stabilsten Ergebnisse. Somit war die Zellpopulationsverdopplungszeit für Einsaatdichten ab 1×10^4 Zellen pro Well etwas kürzer als die von GARLANDA et al. (1994) beschriebenen 16 h. Gründe für die unterschiedlichen Zellpopulationsverdopplungszeiten können durch Faktoren wie unterschiedliche Nährstoffgehalte in Medien, Nutzung anderer Seren, hormonelle Effekte oder andere Abweichungen in den Kulturbedingungen erklärt werden (FRESHNEY et al., 2010b).

Die Zellpopulationsverdopplungszeit ist ein wichtiger Parameter, durch dessen Beobachtung sich unterschiedliche wachstumsfördernde oder -hemmende Einflüsse auf die Zellen beurteilen lassen. Sie ist auch wichtig zur Berechnung benötigter Einsaatdichten bei der Kultivierung der Zellen. Sie liegt z. B. bei den sehr schnell wachsenden Leukaemiezellen der Maus zwischen 12 - 15 h und für viele Primärkulturen, also nicht immortalisierter Zelllinien unterschiedlichen Gewebes, bei über 60 h (FRESHNEY et al., 2010c). Somit gehören die H5V-Zellen zu den sehr schnell wachsenden Zellen. In weiteren Versuchen wurde den H5V-Zellen nach dem 3. Wachstumstag das Serum entzogen. Dies führte dazu, dass die Zellen unmittelbar in ihrem Wachstum gestoppt wurden und die Zellzahl sogar vorübergehend abnahm, um anschließend wieder leicht zuzunehmen. Dass die Zellzahl nach Entzug des Serums so stabil blieb, wurde nicht erwartet. Beispielsweise konnten Vala et al. (2010) in ihren Untersuchungen für humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Lunge (HMVEC-L) schnelle Absterberaten unter Serumentzug zeigen. Bereits nach 24 h sank die Überlebensrate auf

etwa 50 %. Nach 72 h waren fast keine vitalen Zellen mehr vorhanden. In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei den H5V-Zellen um Zellen handelt, die Eigenschaften von Tumoren haben und diese auch auslösen können (GARLANDA et al., 1994), scheint es wahrscheinlich, dass sie starke autonome Wachstumsimpulse innehaben. Es könnte sogar möglich sein, dass sich die durch den Serumentzug abnehmende Zellproliferation besonders günstig auf eine Verwendung als Endothelmodell auswirkt. Hier wären weiter Experimente zur Optimierung des Mediums denkbar. Für die weiteren Versuche dieser Arbeit war es wichtig zu zeigen, dass die H5V-Zellen auch ohne Serum im Medium für einige Tage vital bleiben können. Die Benutzung von Serum kann einige Nachteile haben. So ist die Zusammensetzung vieler Seren nicht vollständig bekannt. Außerdem kann die Zusammensetzung unter den einzelnen Chargen beträchtlich variieren. Neben Albumin und Transferrin beinhaltet fetales bovines Serum zahlreiche weitere Inhaltsstoffe, die die Effekte von Testsubstanzen beeinflussen können. (FRESHNEY et al., 2010a). In dieser Arbeit führte die Verwendung von Serum zur Unterdrückung von Effekten des Zytokins TNF- α . Möglicherweise bewirken die Wachstumsfaktoren im Serum eine solche Überstimulation, dass sich die H5V-Zellen trotz eines antagonistischen Effektes von TNF- α mit maximaler Geschwindigkeit vermehren. Eine andere Erklärung wäre, dass der Effekt von TNF- α nur dann eintritt, wenn bestimmte Kulturbedingungen bestehen. Beispielsweise könnte eine proapoptotische Wirkung nur dann erfolgen, wenn zusätzlich zur TNF- α -Stimulation weitere Signalwege, die wiederum durch Serumentzug bedingt sein könnten, aktiviert werden. Auch eine direkte Inaktivierung von TNF- α oder dessen Rezeptoren durch Inhaltsstoffe im Serum ist möglich. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass im Serum bereits eine so hohe TNF- α -Konzentration vorhanden ist, dass eine weitere Erhöhung nicht ins Gewicht fällt. In weiteren Versuchen könnte die TNF- α -Konzentration in unterschiedlichen Serumchargen bestimmt werden. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass es zwischen bovinem und murinem TNF- α möglicherweise Unterschiede gibt, die sich auf den Effekt auf die H5V-Zellen auswirken könnten.

4.2 Metabolische Aktivität

Zunächst wurden in Vorversuchen die geeignete Einsaatdichte und Inkubationszeit ermittelt. So wurde daraus für alle weiteren Untersuchungen eine Einsaatdichte von 1×10^3 Zellen pro Well bei einer Test-Inkubationszeit von 5 h festgelegt.

4.2.1 Bestrahlung mit Einzeldosen am Röntgentherapiegerät TH200

In den Versuchen mit hitzeinaktiviertem Serum im Medium konnten sowohl 1 h als auch 24 h nach Bestrahlung keine signifikanten Effekte durch Bestrahlung oder durch Stimulation mit TNF- α nachgewiesen werden. Auch eine Erhöhung der TNF- α -Konzentration von 10 ng/ml bzw. 20 ng/ml auf 50 ng/ml bzw. 100 ng/ml lieferte kein anderes Ergebnis. Trends, die feststellbar waren, zeigten teilweise gegensätzliches Verhalten. So waren beim Versuch zur Bestimmung der metabolischen Aktivität 1 h nach Bestrahlung, bei Zugabe von 10 ng/ml bzw. 20 ng/ml TNF- α (Abb. 13) die Werte der metabolischen Aktivität bei einer Bestrahlungsdosis ab 0,5 Gy tendenziell niedriger als bei den unbestrahlten Kontrollen. Bei Zugabe der höheren Konzentration von 50 ng/ml bzw. 100 ng/ml TNF- α waren die Werte der metabolischen Aktivität bei Strahlungsdosen ab 0,5 Gy hingegen eindeutig höher als bei den unbestrahlten Kontrollen (Abb.15). Auch in Anbetracht der hohen Standardabweichung scheinen Abweichungen zwischen den einzelnen Versuchen mit serumhaltigem Medium rein zufälliger Natur zu sein. Interessant war, dass das Serum (FBS) in der Lage war, auch hohe Konzentrationen von bis zu 100 ng/ml TNF- α zu antagonisieren.

Bei Durchführung der Versuche unter Entzug des Serums war 24 h nach Bestrahlung ein eindeutiger hemmender Effekt von TNF- α auf die metabolische Aktivität der H5V-Zellen zu beobachten (Abb. 18), während dieser Effekt 1 h nach Bestrahlung (Abb. 17) noch nicht vorhanden war. Die Reduktion der metabolischen Aktivität war deutlich von der Konzentration des TNF- α abhängig. So führte die hohe Konzentration (20 ng/ml) nach 24 h zu einer Erniedrigung der metabolischen Aktivität auf teilweise unter 40 % des Ausgangsniveaus, wohingegen bei der niedrigeren Konzentration (10 ng/ml) die Werte durchschnittlich um ca. 20 % höher lagen. Dieser Effekt war für alle Konzentrationen signifikant ($p \leq 0,05$) und für die hohe TNF- α -Konzentration teilweise auch sehr signifikant ($p \leq 0,01$).

In Abhängigkeit der Bestrahlung stieg die metabolische Aktivität 24 h nach Bestrahlung bei niedrigsten Dosen von bis zu 0,025 Gy zunächst an, um dann bei höheren Dosen wieder sukzessive abzufallen (Abb. 18). Minimale Werte wurden bei maximaler Bestrahlungsdosis von 1,5 Gy erreicht. Dieser Effekt war nicht signifikant und trat 1 h nach Bestrahlung (Abb. 17) nicht auf. Im Vergleich zur Wirkung des TNF- α war der Einfluss der Bestrahlung auf die metabolische Aktivität der H5V-Zellen damit gering.

TNF- α kann über zahlreiche Rezeptoren eine Apoptose oder auch Nekrose auslösen. Dabei werden über den TNFR1-Rezeptor zunächst TRADD (TNFR-associated death domain) und RIP1 (Receptor-Interacting Protein 1) aktiviert, welche wiederum einen Komplex mit FADD (Fas-associated death

domain) und Procaspase-8 bilden. Schließlich kommt es zur Aktivierung der Caspase 8 und zur Apoptose (MICHEAU & Tschopp, 2003, CHU, 2013). Somit scheint die Verringerung der Zellzahl durch Induktion von Apoptose eine mögliche Ursache für die Abnahme der metabolischen Aktivität zu sein. Eine Induktion der Apoptose durch TNF- α ist für Endothelzellen bekannt und wurde beispielsweise von YU et al. (2009) für Endothelzellen der bovinen Arteria carotis beschrieben. Dabei reduzierte sich die metabolische Aktivität in einem Zellproliferationsassay nach einer Inkubationszeit von 24 h und einer TNF- α -Konzentration von 10 ng/ml um ca. 20 %. Somit war der Effekt im Vergleich zu dieser Arbeit nur ca. halb so stark ausgeprägt. Neben unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen könnten insbesondere auch die dort verwendeten bovinen Endothelzellen der A. carotis (BCEC) andere Eigenschaften als die H5V-Zellen besitzen und dementsprechend auch unterschiedlich stark auf die Wirkung von TNF- α ansprechen.

4.2.2 Fraktionierte Bestrahlung am Röntgentherapiegerät TH200

Bei der fraktionierten Bestrahlung zeigte sich die Wirkung des TNF- α erwartungsgemäß bereits 1 h nach Bestrahlung (Abb. 19) in denjenigen Proben, in denen das TNF- α bereits vor der ersten Bestrahlung zugegeben wurde. Dies folgt aus der längeren Einwirkungszeit, die sich aus der zusätzlichen Inkubationszeit während der fraktionierten Bestrahlung ergibt (Kapitel 2.4.1, Abb. 4). Dementsprechend lag die effektive Einwirkungszeit bei 25 h. Der Effekt durch TNF- α war insgesamt etwas schwächer ausgeprägt als bei den Versuchen mit Einzeldosen. Es zeigte sich eine maximale Abnahme der metabolischen Aktivität um ca. 50 % bei einer Konzentration von 20 ng/ml TNF- α und Zugabe vor Bestrahlung. Dies war für alle Bestrahlungsdosen signifikant ($p \leq 0,05$) und für die höhere Konzentration von 20 ng/ml TNF- α bis auf den Wert bei 1,5 Gy sehr signifikant ($p \leq 0,01$).

24 h nach der letzten Bestrahlung (Abb. 20) war die metabolische Aktivität auch bei Zugabe von TNF- α nach Bestrahlung signifikant erniedrigt ($p \leq 0,05$). Die meisten Werte, insbesondere bei den höheren Konzentrationen und bei Zugabe von TNF- α vor Bestrahlung, waren sogar sehr signifikant erniedrigt ($p \leq 0,01$). Wie zu erwarten war führten höhere Konzentrationen von TNF- α und längere Inkubationszeiten zu einer stärkeren Verminderung der metabolischen Aktivität.

Obwohl die Gesamtdosen insgesamt viermal höher lagen, zeigte sich sowohl 1 h nach Bestrahlung (Abb. 19) als auch 24 h nach Bestrahlung (Abb. 20) ein ähnlicher Verlauf wie bei den Experimenten mit Einzeldosen 24 h nach Bestrahlung (Abb. 18). Dementsprechend zeigten sich wiederum ein minimaler initialer Anstieg der metabolischen Aktivität bei Einzeldosen bis 0.0125 oder 0.025 Gy

und ein anschließender Abfall für den Versuch 24 h nach Bestrahlung. Erst bei Einzeldosen von 1.0 Gy oder 1.5 Gy sank die metabolische Aktivität wieder unter das Niveau der unbestrahlten Kontrolle. Abweichungen dieses Verlaufes gab es 1 h nach fraktionierter Bestrahlung. Hier kam es zu einem geringfügigen Wiederanstieg der metabolischen Aktivität bei 1,5 Gy. Diese Effekte waren bis auf den Anstieg der metabolischen Aktivität von 0 Gy auf 0,125 Gy (Gesamtdosis 0,5 Gy) in der Kontrollkurve 24 h nach Bestrahlung nicht signifikant.

Verglichen mit der Bestrahlung in Einzeldosen war der Effekt bei vierfach fraktionierter Bestrahlung und entsprechend höherer Dosis nicht ausgeprägter. Beim Vergleich der Gesamtdosen zeigte sich ein scheinbar gegenläufiger Effekt. So führte die Einzeldosis von 0,5 Gy (Abb. 18) schon zu einer Abnahme der metabolischen Aktivität, wohingegen die Gesamtdosis von 0,5 Gy (Abb. 20; $4 \times 0,125$ Gy) zu einer Zunahme führte. Möglicherweise besteht eine proliferationsfördernde Wirkung durch niedrige Bestrahlungsdosen $< 0,5$ Gy, welche mit zunehmender Dosis von den zytotoxischen Effekten der Bestrahlung überlagert wird. Da diese Ergebnisse nicht signifikant sind, müssen auch zufällige Schwankung oder ein systemischer Fehler für die Abweichungen in Betracht gezogen werden. Untersuchungen von VALA et. al. (2010) konnten zeigen, dass Bestrahlungsdosen unter 0.8 Gy nicht zur Apoptose führen und die Angiogenese sogar fördern können. Dabei führte niedrig dosierte Strahlung zur Aktivierung des VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Rezeptor-2, in deren Folge die Wirkung des Angiogenesehemmers Bevacizumab verhindert werden konnte. Darüber hinaus konnten die vom Wachstumsfaktor VEGF durch Phosphorylierung aktivierten antiapoptotischen Signalwege PI3K/Akt (Phosphatidylinositide 3-kinases/Protein Kinase B) und MEK/ERK (Mitogen-activated Protein Kinase Kinase/Extracellular-signal Regulated Kinases; EDWARDS et al., 2002) auch VEGF-unabhängig durch LD-RT aktiviert werden (VALA et. al., 2010). Für diese Signalwege wurde auch eine Anregung der Angiogenese in mikrovaskulären Myokardzellen beschrieben (WANG et al., 2012). Bei Zugabe von Hemmstoffen dieser Signalwege war LD-RT sogar in der Lage die Apoptose der Endothelzellen zu verhindern. Analog zu den Versuchen dieser Arbeit war dabei keine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung zu beobachten (VALA et. al., 2010). Demgegenüber konnte von SOUCY et al. (2010) bei Ganzkörperbestrahlung mit γ -Strahlung von Mäusen ab Dosen von 0,5 Gy eine Abnahme der Aussprossung und des Wachstums von Endothelzellen nach Einbettung 1 mm großer Aortenteilresektaten in Endothelzellmedium nachgewiesen werden, allerdings wurden hier für Bestrahlungswerte $< 0,5$ Gy keine Daten erfasst. In Experimenten von PLUDER et al. (2011) konnte bei der Bestrahlung der humanen Endothelzelllinie EA.hy926 mit 0,2 Gy keine Wirkung auf die

Zahl der Apoptosen nachgewiesen werden. Allerdings wurde in der Arbeit von PLUDER et al. zur Bestrahlung eine Kobaltquelle mit einer geringeren Dosisleistung verwendet. Wie bereits von SOUCY et al. (2010) diskutiert, könnten die unterschiedlichen Photonenenergien unabhängig von der Bestrahlungsdosis die Wirkung auf die Endothelzellen beeinflussen.

4.2.3 Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger

Die Versuche mit serumhaltigem Medium wurden nur einmal durchgeführt und besitzen deshalb keine statistische Relevanz. Im Trend stieg die metabolische Aktivität mit zunehmender Bestrahlungsdosis sowohl 1 h als auch 24 h nach Bestrahlung (Abb. 21, Abb. 22).

Der Entzug des Serums führte zunächst bei einer Einsaatdichte von 1×10^3 Zellen pro Well zu gegensätzlichen Ergebnissen und hatte aufgrund sehr niedriger absoluter Werte (nur geringfügig höher als zellfreies Medium) kaum Relevanz. Jedoch zeigte sich der Effekt von TNF- α 24 h nach Bestrahlung (Abb. 24) bei allen Werten deutlich. Dieser massive Abfall der metabolischen Aktivität unter Entzug des Serums wurde so nicht erwartet, zumal sich die Zellen nach Serumentzug in den Wachstumskurven ohne relevanten Verlust für mehrere Tage weiterkultivieren ließen (vgl. Abb. 10). Allerdings lag die Zellkonzentration für die Wachstumskurven bei Serumentzug um mehr als einer Größenordnung höher als bei der Analyse der metabolischen Aktivität. Die Zellen schienen bei der Einsaatdichte von 1×10^3 Zellen pro Well nicht mehr über längere Zeit lebensfähig zu bleiben. Mit der Erhöhung der Einsaatdichte auf 5×10^3 Zellen pro Well konnte dann 24 h nach Bestrahlung (Abb. 26) bei akzeptabler Standardabweichung ein konzentrationsabhängiger Effekt von TNF- α nachgewiesen werden, der prinzipiell der Wirkung der Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät entsprach, jedoch etwas geringer ausgeprägt war. Zudem zeigte sich mit zunehmender Bestrahlungsdosis eine leichte Abnahme der metabolischen Aktivität. Diese Abnahme der metabolischen Aktivität war bei Zugabe von 20 ng/ml TNF- α nach Bestrahlung ab 2 Gy, bei Zugabe von 20 ng/ml vor Bestrahlung ab 6 Gy und bei der TNF- α -Konzentrationen von 10 ng/ml vor oder nach Bestrahlung sowie der Kontrollkurve ab 4 Gy signifikant. Für alle Konzentrationen von TNF- α und die Kontrollkurve war die Abnahme der metabolischen Aktivität von 0 Gy auf 1 Gy am deutlichsten ausgeprägt, wohingegen die weitere Abnahme bis zu einer Dosis von 6 Gy verhältnismäßig gering ausfiel. Weiterhin lagen die Werte der metabolischen Aktivität jeweils etwas tiefer, wenn TNF- α vor der Bestrahlung zugegeben wurde, als wenn es danach hinzugefügt wurde. Weil dieser Effekt sehr gering ausgeprägt war, ist dieser Unterschied vermutlich auf die um ca. 1 h längere Inkubationszeit mit TNF- α zurückzuführen. Die Beteiligung eines strahleninduzierten

Effektes könnte jedoch auch möglich sein. Eine Abnahme der Zellproliferation und eine Induktion von Apoptosen durch Bestrahlung wurden beispielsweise für die humanen Endothelzellen der Umbilikalvene (HUVEC; human umbilical vascular endothelial cells) und bovine mikrovaskuläre Zellen beschrieben (ABDOLLAHI et al., 2005; EDWARDS et al., 2002; LANGLEY et al., 1997) und könnten die Abnahme der metabolischen Aktivität erklären. In welchem Maße die Induktion von Apoptose in dieser Arbeit für die Abnahme der metabolischen Aktivität verantwortlich ist, könnte beispielsweise durch die Messung der Caspase-3-Aktivität als Marker für die Apoptose ermittelt werden. Eine andere Möglichkeit zur Erklärung der erniedrigten metabolischen Aktivität nach Bestrahlungsdosen ab 1 Gy wäre die Versetzung der Endothelzellen in einen der Seneszenz ähnlichen Zustand, wie er für bovine Endothelzelllinie BAEC (bovine aortic endothelial cells) von OH et al. (2001) nach Bestrahlung mit einer Cäsiumquelle beobachtet wurde. Seneszenz bedingt die begrenzte Teilungsfähigkeit humaner Zellen in *In-vitro*-Kulturen und geht mit charakteristischen Veränderungen des Phänotyps einher. Dazu gehören Veränderungen in der Morphologie und Genexpression (MINAMINO et al., 2004). Veränderungen der DNA, wie nicht reparable Doppelstrangbrüche und die Verkürzung der Telomere, scheinen an ihrer Entwicklung beteiligt zu sein (SEDELNIKOVA et al., 2004). Untersuchungen von IGARASHI et al., 2007 mit bovinen Endothelzellen der Aorta (BAECs) und HUVECs nach Bestrahlung mit 8 Gy zeigten eine Vergrößerung der Zellen und eine erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität als charakteristische Zeichen der Seneszenz. Diese Irradiation-induced senescence-like (IRSL) Phänotypen zeigten im Vergleich zu den nicht bestrahlten Zellen auch eine veränderte Genexpression und waren in ihrem Wachstum verlangsamt. Insbesondere wurden Gene für die DNA-Replikation und Beeinflussung des Zellzyklus downreguliert.

Für HUVEC-Zellen zeigte sich im Stadium der Seneszenz eine FAS-Rezeptor (tumor necrosis factor receptor superfamily member 6) vermittelte erhöhte Empfindlichkeit gegen TNF- α induzierte Apoptose (JEON, BOO, 2013). Veränderungen des Phänotyps ähnlich der Seneszenz könnten somit eine Abnahme des Zellwachstums und daraus folgend auch der metabolischen Aktivität bedingen. Allerdings wurden diese Daten drei Tage nach Bestrahlung erhoben, während in dieser Arbeit die Zellen bereits 24 h nach Bestrahlung untersucht wurden. Hier könnte eine Untersuchung der Aktivität des Enzyms β -Galaktosidase aufschlussreich sein (IGARASHI et al., 2007), denn die Aktivität der β -Galaktosidase ist im Stadium der Seneszenz charakteristischerweise erhöht (DIMRI et al. 1995).

4.3 Klonogenes Überleben

Auch bei den Experimenten zur Untersuchung des klonogenen Überlebens zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der H5V-Zellen von der Anwesenheit von Serum im Medium. Der Serumentzug führte zur vollständigen Verhinderung der Koloniebildungsfähigkeit, wohingegen ein temporärerer Serumentzug für 48 h zu einer Erniedrigung der Plattiereffizienz auf etwa ein Viertel des ursprünglichen Wertes führte (Abb. 29). Beim Serumentzug für 72 h (fraktionierte Bestrahlung, Abb. 30) fiel die Plattiereffizienz sogar auf unter 10 % des Wertes der mit Serum inkubierten H5V-Zellen. Für eine akzeptable Auswertung wurde deshalb die ursprünglich ermittelte optimale Einsaatdichte (Abb. 27) um den Faktor 10 auf 4×10^3 Zellen pro Well erhöht.

Bei der Bestrahlung am Röntgentherapiegerät (RTG) mit Einzeldosen (Abb. 31) zeigte sich eine minimale, nicht signifikante Erhöhung, des klonogenen Überlebens um maximal 14 % (0,025 Gy) für Bestrahlungsdosen bis zu 0,125 Gy in allen Ansätzen und bis 0,25 Gy bei Zugabe von 10 ng/ml TNF- α . Mit weiter steigenden Dosen kam es dann zu geringfügigen, nicht signifikanten, Abnahmen des klonogenen Überlebens bis auf minimal 85% des Kontrollwertes (0 Gy nativ).

Bei der fraktionierten Bestrahlung am RTG zeigten sich ebenfalls bei Bestrahlungsdosen bis zu 0,025 Gy tendenziell minimale erhöhte Werte der Plattiereffizienz mit anschließenden, nicht signifikant erniedrigten Werten bis zur Einzeldosis von 0,5 Gy (Gesamtdosis 2 Gy). In Anbetracht dessen, dass auch die Versuche zur metabolischen Aktivität für diesen Dosisbereich minimal erhöhte Werte zeigten, könnte dies auf einen geringfügigen stimulierenden Effekt der niedrig dosierten Bestrahlung ($< 0,25$ Gy) hinweisen. Versuche von THOMAS et al. (2003) zeigten für bovine Endothelzellen ebenfalls eine stimulierende Wirkung auf das klonogene Überleben bei Bestrahlungsdosen unter 0,25 Gy. Interessant war, dass sowohl bei der klonogenen (Abb. 31; Abb. 32) als auch bei der metabolischen Aktivität dieser Effekt von der jeweiligen Einzeldosis und nicht von der Gesamtdosis abhing. Für die Abstände zwischen den Fraktionen (Abb. 4) wurden 6 bzw. 12 h festgelegt. In diesem Sinne wäre es interessant, die Abstände und Anzahl der Fraktionen zu variieren, um festzustellen, ob diese Stimulation durch LD-RT auf das klonogene Überleben und die metabolische Aktivität der H5V-Zellen auch bei kürzeren Abständen oder erhöhter Fraktionszahl (Gesamtdosis) analog zur Bestrahlung mit Einzeldosen erhalten bleibt.

Für die fraktionierte Bestrahlung am RTG (Abb. 32) zeigte sich ab einer Gesamtdosis von 4 Gy ein signifikanter Abfall der klonogenen Aktivität mit typischer Schulter im Bereich bis 2 Gy. Nach Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger (Abb. 33) war solch eine Schulter erwartungsgemäß nicht vorhanden. Während bei der fraktionierten Bestrahlung zwischen den einzelnen Fraktionen Zeit für

Reparaturmechanismen zur Verfügung stehen, entfallen diese bei der Bestrahlung mit hohen Einzeldosen. Bei fraktionierter Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 2 Gy zeigten sich noch keine signifikanten Veränderungen, wohingegen das klonogene Überleben nach Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger (2 Gy) auf Werte zwischen 54 % und 63 % abnahm. Bestrahlung mit Einzeldosen von 4 Gy oder 6 Gy am Linearbeschleuniger führten zu einer Erniedrigung des klonogenen Überlebens auf 18 % bis 20 % (4 Gy) bzw. 7 % bis 10 % (6 Gy). Bei der fraktionierten Bestrahlung mit den gleichen Dosen ergaben sich Werte von 39 % - 48 % für 4 Gy und 12 % bis 15 % für 6 Gy. Somit lagen die Werte für die Bestrahlungsdosis von 6 Gy wieder dichter beieinander, was durch das Abnehmen der kompensatorischen Reparaturmechanismen mit zunehmender Bestrahlungsdosis bei der fraktionierten Bestrahlung erklärt werden kann. Die stärkere Verminderung der Koloniezahl nach Bestrahlung mit Einzeldosen am Linearbeschleuniger im Vergleich zu fraktionierter Bestrahlung am RTG wird neben dem Muster der Fraktionierung von der Dosisleistung der Bestrahlungsquelle beeinflusst. Diese war mit 3,75 Gy/min beim Linearbeschleuniger ca. 7mal höher als am RTG (0,52 Gy/min). Für eine Quantifizierung des Einflusses der Dosisleistung könnten ergänzend Experimente mit Einzeldosen von 2, 4 und 6 Gy am RTG durchgeführt werden. Verglichen mit anderen Experimenten mit humanen Endothelzellen aus Tumorgewebe oder normalem Gewebe zeigte sich eine Abnahme der Überlebensfraktion, die im Verlauf ähnlich der Kurve normaler humaner Endothelzellen war (RIQUIER et al., 2013; PARK et al., 2012a). Bei den aus Tumorzellen extrahierten Endothelzellen verlief die Überlebenskurve dagegen deutlich steiler (PARK et al. 2012a). Demnach war das Verhalten der murinen H5V-Zellen, obwohl sie teilweise tumorigenes Potential besitzen (Vgl. Kapitel 2.1), in Bezug auf ihr klonogenes Überleben mit normalen humanen Endothelzellen vergleichbar. Allerdings zeigten sich auch innerhalb der normalen Endothelzellen in Abhängigkeit vom Ursprungsgewebe beträchtliche Schwankungen der Überlebenskurven (Parke et al., 2012b).

Verglichen mit den Versuchen zur Bestimmung der metabolischen Aktivität war interessant, dass sich die Zugabe von TNF- α nicht auf das klonogene Überleben der H5V-Zellen auswirkte. Da die Bestrahlung 24 h nach Entzug des Serums durchgeführt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Zellen in einer kritischen Phase befunden haben. Dies zeigen auch die durchgehend sehr niedrigen Plattiereffizienzen ($PE < 0,05$). Umso unerwarteter war es, dass die Zugabe von TNF- α nicht zu einer weiteren Abnahme führte. TNF- α kann *in-vitro* über den TNFR1 zur Apoptose in Endothelzellen führen (WAJANT et al., 2003). Bei der zytotoxischen Wirkung der ionisierenden Strahlung hingegen dominiert der klonogene Zelltod, also der Verlust der

Reproduktionsfähigkeit (Steel 2001). Die Einwirkzeit des TNF- α betrug bei den Koloniebildungstests je nachdem, ob die Zugabe vor oder nach Bestrahlung stattfand 24 h bzw. 48 h für die Bestrahlung mit Einzeldosen und 48 h bzw. 72 h für die fraktionierte Bestrahlung. Somit war diese sogar teilweise länger als bei den Versuchen zur Bestimmung der metabolischen Aktivität. Falls die Erniedrigung der metabolischen Aktivität (Vgl. Kapitel 4.2) vollständig durch Apoptosen bedingt ist, so wäre auch bei den für Koloniebildungstests eingesäten Zellen ein signifikanter Effekt zu erwarten gewesen. Ein wichtiger Unterschied ist jedoch die bei den Koloniebildungstests um mehrere Zehnerpotenzen niedrigere Einsaatdichte. Möglicherweise wird durch die vereinzelt wachsenden Zellen ein Mechanismus ausgelöst, der die Wirkung des TNF- α neutralisiert oder die Wirkung kommt überhaupt erst durch Interaktion mit benachbarten Zellen zustande. Seit den neunziger Jahren konnten in zahlreichen Studien sogenannte Bystander Effekte nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um Effekte, bei denen Zellen die selbst keiner Bestrahlung ausgesetzt waren, über indirekte Mechanismen von benachbarten bestrahlten Zellen beeinflusst werden. Diese Effekte können beispielsweise über Medien/Plasma oder Gap-Junctions vermittelt werden (KADHIM et al., 2013). In unterschiedlichen Experimenten mit HUVEC-Zellen konnten extrazelluläre Fragmente genomischer DNA als Signalüberträger eines Bystander Effektes bei niedrig dosierter Bestrahlung identifiziert werden (ERMAKOV et al., 2011; KOSTYUK et al., 2011). Mittlerweile sind zahlreiche Signalwege, die Bystander Effekte auslösen können, bekannt. Beispielsweise kann TGF- β_1 von bestrahlten Zellen freigesetzt werden und in nicht direkt bestrahlten Zellen zu DNA-Schäden und Bildung freier Radikale führen (SHAO et al., 2008). Darüber hinaus sind zahlreiche weitere Mechanismen bekannt, die unter anderem auch zu einer Induktion von Apoptose in Bystander Zellen führen können (FURLONG et al., 2013; HEI et al., 2011). Diese Apoptosen könnten z. B. durch TNF- α über eine Aktivierung der Cyclooxygenase 2 ausgelöst werden (ZHOU et al. 2008).

Eine andere Erklärung wäre, dass die Abnahme der metabolischen Aktivität bzw. die Auslösung von Apoptose nur diejenigen Zellen betrifft, die ohnehin nicht mehr in der Lage zur Zellteilung sind. Da der Entzug des Serums zur Wachstumsverzögerung führen kann, wäre es möglich, dass sich nach der Bestrahlung eine bedeutende Zahl der H5V-Zellen in einem Stadium befand, in dem nur eine eingeschränkte Zellteilung und somit auch nur eine verringerte Koloniebildung möglich war. Hier könnten beispielsweise Zellzyklusmessungen mittels Durchflusszytometrie weitere Hinweise geben. Unbeeinträchtigte Zellen, die für die Koloniebildung verantwortlich sind, könnten dagegen unbeeinflusst bleiben. Dahingegen wurden beispielsweise für humane und murine Zelllinien des

Kolonkarzinoms strahlensensibilisierende Wirkungen von TNF- α nachgewiesen. Dabei kann TNF- α durch eine Downregulierung von E-cadherin und Claudin 4 zu einer Unterbrechung der Zell-Zell-Verbindungen führen und somit die Strahlensensibilität erhöhen (YI et al., 2009; LARBOURET et al., 2007). Im Rahmen hoch dosierter Bestrahlung zur Tumorthherapie wurden in unterschiedlichen Studien Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und Tumorzellen beschrieben. Dabei kann es durch Bestrahlung zur Freisetzung von VEGF aus Tumorzellen kommen, welcher die Radiosensibilität der Endothelzellen erniedrigen kann. Beispielsweise konnten BUCKEL et al. (2013) in *In-vivo*-Versuchen am Mausmodell zeigen, dass sich durch virale Einbringung eines Gens welches Anti-VEGF-Antikörper produziert, die Strahlensensibilität von Glioblastom-Tumoren steigern lässt. Dies wurde durch eine Abnahme der VEGF-vermittelten Gefäßbildung induziert. Die Hemmung der Vaskularisation von Tumoren, beispielsweise durch die Hemmung von Proliferation oder direkte Schädigung von Endothelzellen stellt somit eine vielversprechende Ergänzung zur Strahlentherapie im Rahmen der Tumorthherapie dar.

4.4 Bestimmung der TGF- β_1 -Freisetzung

In den Experimenten zur Bestimmung der TGF- β_1 -Freisetzung zeigte sich sowohl 4 h als auch 24 h nach Bestrahlung eine erhöhte TGF- β_1 -Konzentration nach Stimulation mit TNF- α . Dies galt sowohl für die Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger als auch mit dem Röntgentherapiegerät. Diese Erhöhung betrug für die Werte 24 h nach Bestrahlung bis über 40 % und war signifikant ($p < 0,05$) oder sehr signifikant ($p < 0,01$). 4 h nach Bestrahlung war die TGF- β_1 -Konzentration um maximal ca. 20 % erhöht. Dies war jedoch nicht signifikant.

Dagegen war der Einfluss der Bestrahlung auf die TGF- β_1 -Freisetzung der H5V-Zellen deutlich geringer. Für die Einzeldosen zeigte sich 4 h nach Bestrahlung bei den mit TNF- α stimulierten und bestrahlten Proben eine nicht signifikante geringfügige Abnahme der TGF- β_1 -Freisetzung um maximal ca. 10 % bei der Bestrahlungsdosis von 2 Gy (Abb. 34). Auch 24 h nach Bestrahlung (Abb. 35) war mit Ausnahme des Wertes bei der Bestrahlungsdosis von 0,81 Gy, dessen Wert fast identisch wie bei der Kontrolle war, eine Abnahme der TGF- β_1 -Freisetzung in den mit TNF- α stimulierten Proben zu beobachten. Diese fiel jedoch im Vergleich zu den Werten 4 h nach Bestrahlung mit maximal 7 % noch etwas geringer aus. Im Gegensatz dazu zeigten Experimente von RÖDEL et al. (2002; 2004) eine Zunahme der TGF- β_1 -Freisetzung für niedrigere Bestrahlungsdosen von bis zu 1 Gy. Allerdings bestehen hinsichtlich der Methodik wesentliche Unterschiede. So wurden in den Versuchen von RÖDEL et al. andere Endothelzelllinien (EA.hy.926 EC; mlEnd1)

verwendet. Weitere Unterschiede sind die Verwendung von Serum sowie eine höhere Dosisleistung und Röhrenspannung des Röntgentherapiegerätes.

Auch nach Bestrahlung am Linearbeschleuniger (Abb. 36) zeigte sich 4 h nach Bestrahlung für die bestrahlten Proben eine Verminderung der TGF- β_1 -Freisetzung. Diese Verminderung war bei den mit TNF- α stimulierten Proben deutlicher ausgeprägt und betrug bei Stimulation mit TNF- α und der Bestrahlungsdosis 6 Gy knapp 20 %.

24 h nach Bestrahlung am Linearbeschleuniger (Abb. 37) zeigte sich sowohl für die nativen als auch für die mit TNF- α stimulierten Proben eine diskontinuierliche Dosis-Wirkungsbeziehung mit einem Maximum der TGF- β_1 -Freisetzung bei 2 Gy. Minima gab es bei Bestrahlungsdosen von 1 Gy und 4 Gy. Das Maximum bei 2 Gy war zur TNF- α stimulierten Kontrolle (0 Gy) nicht signifikant erhöht. Allerdings zeigten sich zu den Minima bei 1 Gy signifikante ($p < 0,05$) und für 4 Gy sogar sehr signifikante Unterschiede ($p < 0,01$). Im nativen Ansatz war lediglich das Minimum bei 1 Gy gegenüber der Kontrolle (0 Gy) erniedrigt. Dieser Verlauf wurde nicht erwartet, zumal die Bestrahlung mit ebenfalls 2 Gy durch das Röntgentherapiegerät zu einer Verminderung der TGF- β_1 -Freisetzung führte. Die biologische Strahlungswirkung ist durchaus von der Dosisleistung abhängig. In dieser Arbeit war die Dosisleistung mit 3,75 Gy/min am Linearbeschleuniger etwa 7mal höher als am Röntgentherapiegerät (0,52 Gy/min). Allerdings ist dieser Einfluss vergleichsweise klein und kann diese großen Unterschiede kaum erklären (LING et al, 2010). Weitere Wiederholungen dieses Experimentes könnten sinnvoll sein, um die erhaltenen Daten zu verifizieren.

Die Wirkung der Stimulation mit TNF- α auf die TGF- β_1 -Sekretion der H5V-Zellen war hingegen mit hoher Wahrscheinlichkeit durch einen realen Effekt verursacht. Obwohl dieser erst 24 h nach Bestrahlung signifikant war, zeigte sich die Wirkung schon 4 h nach Bestrahlung in allen Proben. Deshalb kann von einer konzentrationsabhängigen Wirkung ausgegangen werden. Ob dieser Effekt durch TNF- α direkt ausgelöst wird, bleibt hierbei fraglich. Eine erhöhte Expression von TGF- β_1 nach Stimulation mit TNF- α konnte bereits für bronchiale, alveolare Epithelzellen und Fibroblasten der Lunge von Mauseellen sowie für humane proximale Tubuluszellen der Niere nachgewiesen werden (PHILLIPS et al., 1996; WARSHAMANA et al., 2001). Dieser Effekt könnte durch die Extracellular signal-regulated kinase (ERK) vermittelt werden und zu einer Verlängerung der Halbwertszeit der mRNA von TGF- β_1 führen (SULLIVAN et al., 2004). Es ist bekannt, dass sich TGF- β_1 in Abhängigkeit von der Konzentration sowohl stimulierend als auch hemmend auf das Wachstum von Endothelzellen auswirken kann. Dabei werden bei niedrigen TGF- β_1 -Dosierungen pro-angiogene Faktoren und Proteasen aktiviert, wohingegen bei höheren Konzentrationen das

Wachstum von Endothelzellen gehemmt wird (CARMELIET 2003). Diese gegensätzlichen Effekte werden durch zwei unterschiedliche Typ-1-Rezeptoren der Endothelzellen vermittelt. Während der auf Endothelzellen beschränkt exprimierte ALK1-Rezeptor (activin receptor-like kinase 1) eine stimulierende Wirkung auf die Proliferation und Migration hat, führte die Aktivierung des ALK5 Rezeptors zu einem gegensätzlichen Effekt (LEBRIN et al., 2005). Auch in epithelialen Tumoren, wie dem Kolonkarzinom, kann TGF- β_1 zu einer Inhibierung des Wachstums führen. Allerdings kann es durch TGF- β_1 vermittelt im Spätstadium auch zu einer Zunahme des Tumorwachstums kommen (BIERIE & MOSES, 2006; SIMMS et al., 2012).

GENG et al. (2013) konnten zeigen, dass in einer Zelllinie des Kolonkarzinoms die Expression von VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) durch TGF- β_1 gehemmt werden kann. VEGF ist ein zentraler Regulator der Angiogenese, der zu einer Steigerung der Aussprossung und Proliferation von Endothelzellen führt (FERRARA et al., 1997). Neben der in Kapitel 4.2 diskutierten direkten proapoptotischen Wirkung von TNF- α auf die H5V-Zellen könnte auch die erhöhte Freisetzung von TGF- β_1 mit verminderter Expression von VEGF einhergehen und zur Abnahme der Proliferationsrate und somit auch der metabolischen Aktivität beitragen. In diesem Sinne wäre es interessant in weiteren Experimenten die VEGF-Konzentration im Überstand der H5V-Zellen zu untersuchen, denn ein Nachweis einer verminderten VEGF-Konzentration im Überstand der H5V-Zellen könnte diese These untermauern.

Darüber hinaus kann TGF- β_1 zu einer erhöhten Expression von TNF- α durch antigenpräsentierende (APC) Zellen führen (MASLI et al., 2008). Im Gegensatz dazu wurde bei Makrophagen eine durch TGF- β_1 induzierte Abnahme proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α , beschrieben (MCDONALD et al., 1999). Das Zytokin TGF- β_1 kann eine sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkung haben. Scheinbar trägt TGF- β_1 in der initialen Entzündungsphase zu einer Stimulation des Immunsystems bei, wohingegen es im weiteren Verlauf zur Hemmung der Leukozyteninfiltration kommt (LI et al., 2006). Somit könnte die durch TNF- α induzierte endotheliale TGF- β_1 Freisetzung, je nach Phase und Art der Entzündung sowie in Abhängigkeit von weiteren Wechselwirkungen zwischen Zytokinen und Immunzellen, entweder zu einer Aktivierung oder Hemmung des Immunsystems führen. Obwohl in der Erforschung des Immunsystems bereits große Fortschritte erzielt wurden, sind zahlreiche weitere Untersuchungen notwendig, um die zahlreichen komplexen Wechselwirkungen pro- und antiinflammatorischer Zytokine sowie unterschiedlicher Immunzellen besser zu verstehen.

4.5 Stimulation mit TNF- α

TNF- α hat eine Schlüsselrolle sowohl in der akuten als auch im chronischen Entzündungsgeschehen. Es hat eine pyretische Wirkung und kann die Freisetzung anderer Entzündungsmediatoren induzieren. Darüber hinaus ist TNF- α an der Pathogenese zahlreicher Autoimmunerkrankungen beteiligt (CHU 2012). Aufgrund dieser ausgeprägten stimulierenden Wirkung auf das Immunsystem wurde TNF- α bereits in zahlreichen Untersuchungen zur Simulation entzündlicher Bedingungen verwendet. Beispielsweise führt die Stimulation mit TNF- α zu einer Induktion der für die Einwanderung von Leukozyten wichtigen Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin, ICAM und VCAM (HILDEBRANDT 2002; MADAN et al., 2004 KUMAR et al., 2007). In dieser Arbeit sollte die Wirkung einer chronischen Entzündung simuliert werden, um die Endothelzellen zu aktivieren. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der metabolischen Aktivität und eine Erhöhung der TGF- β_1 -Freisetzung durch Stimulation mit TNF- α . Die Wirkung der Bestrahlung wurde nicht signifikant beeinflusst. Effekte auf metabolische Aktivität, klonogenes Überleben und TGF- β_1 -Freisetzung wurden bereits in den entsprechenden Kapiteln diskutiert. Bezüglich der Simulation eines entzündlichen Geschehens handelt es sich bei diesen Experimenten um ein stark vereinfachtes Schema. Die TGF- β_1 -Freisetzung kann gegenregulatorisch bedingt sein. Weitere Versuche insbesondere unter Verwendung von Co-Kulturen mit anderen Entzündungszellen, wie Leukozyten oder Makrophagen, wären sinnvoll, um ein näher an der Realität liegendes Setting zu gewährleisten.

5 Zusammenfassung

Um eine mögliche strahleninduzierte Modulation von Entzündungsreaktionen näher zu charakterisieren, sollte in dieser Arbeit die Wirkung niedrig dosierter Strahlung auf Endothelzellen (H5V) anhand verschiedener *In-vitro*-Methoden untersucht und mit der der hoch dosierten Strahlung verglichen werden. Zur Simulation eines entzündlichen Geschehens wurde dazu eine Stimulation der Zellen mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α durchgeführt. Die Bestrahlung sollte sowohl am Röntgentherapiegerät (200 kV), wie es klassischerweise zur Schmerzbestrahlung benigner Erkrankungen verwendet wird, als auch am Linearbeschleuniger (6 MeV) durchgeführt werden. Dabei wurde am Röntgentherapiegerät sowohl der Einfluss von Einzeldosen als auch der fraktionierten Bestrahlung analysiert. Weiterhin wurde der Effekt des Serums im Medium auf das Wachstum, das klonogene Überleben und die metabolische Aktivität der H5V-Zellen ermittelt.

Zusammengefasst konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

- Obwohl Serum (FBS) eine starke proliferationsfördernde Wirkung besitzt, konnten die H5V-Zellen auch ohne Serum über mehrere Tage ohne erhöhte Absterberate weiterkultiviert werden.
- Die Stimulation der H5V-Zellen mit TNF- α führte zu einer Abnahme der metabolischen Aktivität. Dieser Effekt war durch Zusatz von hitzeinaktiviertem Serum im Medium vollständig antagonisierbar. Das klonogene Überleben hingegen blieb von einer Stimulation mit TNF- α in den genutzten Konzentrationen unbeeinflusst.
- Niedrige Bestrahlungsdosen (Einzeldosen $\leq 0,25$ Gy) führten tendenziell zu einer leichten Zunahme der metabolischen Aktivität und des klonogenen Überlebens der H5V-Zellen, wohingegen höhere Dosen zu einer Abnahme selbiger führten.
- Einzeldosen mit dem Linearbeschleuniger resultierten in einer deutlich stärkeren Abnahme des klonogenen Überlebens als vergleichbare Gesamtdosen der fraktionierten Bestrahlung mit dem Röntgentherapiegerät. Hohe Bestrahlungsdosen von bis zu 6 Gy führten zu einem starken Abfall des klonogenen Überlebens der H5V-Zellen, wohingegen die metabolische Aktivität nur geringfügig abnahm.
- Eine Stimulation mit TNF- α führte bei den H5V-Zellen zu einer gesteigerten Expression von TGF- β_1 , wohingegen sich die Bestrahlung nur geringfügig und in den mit TNF- α stimulierten Proben eher negativ auf die TGF- β_1 -Freisetzung auswirkte.

Endothelzellen spielen in der antiinflammatorischen Behandlung benigner Erkrankungen mit niedrig dosierter Strahlentherapie eine zentrale Rolle. In dieser Arbeit konnte anhand der gewählten Methoden ein Einfluss der Bestrahlung auf die H5V-Endothelzellen nachgewiesen werden. Für weitere Untersuchungen sollten die Modelle weiter ausgebaut werden, beispielsweise durch Prüfung weiterer Endothelzelllinien oder auch Einbeziehung anderer Immunzellen in Co-Kulturen. Durch Letzteres wird die *In-vivo*-Situation näher wiedergespiegelt. Auch die Verwendung von 3D-Zellkulturmodellen könnte in diesem Zusammenhang eine vielversprechende Methodenerweiterung darstellen.

Literaturverzeichnis

- ABDOLLAHI, A., GRIGGS, D. W., ZIEHER, H., ROTH, A., LIPSON, K. E., SAFFRICH, R., GRÖNE, H.-J., HALLAHAN, D. E., REISFELD, R. A., DEBUS J., NIETHAMMER, A. G., HUBER, P. E. (2005). Inhibition of $\alpha_v\beta_3$ integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. *Clinical Cancer Research*, 11(17), 6270–6279.
- ANTON, D., DABADGHAO, S., PALUCKA, K., HOLM, G., YI, Q. (1998). Generation of dendritic cells from peripheral blood adherent cells in medium with human serum. *Scandinavian journal of immunology*, 47(2), 116–21.
- AWA, A. A., SOFUNI, T., HONDA, T., ITOH, M., NERIISHI, S., OTAKE, M. (1978). Relationship Between the Radiation Dose and Chromosome of Aberrations in Atomic Hiroshima and Bomb Survivors Nagasaki. *Journal of Radiation Research*, 19, 126-140.
- BIERIE, B., & MOSES, H. L. (2006). TGF-beta and cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, 17 (1-2), 29–40.
- BOGDÁNDI, E. N., BALOGH, A., FELGYINSZKI, N., SZATMÁRI, T., PERSA, E., HILDEBRANDT, G., SÁFRÁNY, G., LUMNICZKY, K. (2010). Effects of low-dose radiation on the immune system of mice after total-body irradiation. *Radiation research*, 174(4), 480–89.
- BUCKEL, L., ADVANI, S. J., FRENTZEN, A., ZHANG, Q., YU, Y. A., CHEN, N. G., EHRIG, K., STRITZKERET, J., MUNDT, A. J., SZALAYAL, A. A., (2013). Combination of fractionated irradiation with anti-VEGF expressing vaccinia virus therapy enhances tumor control by simultaneous radiosensitization of tumor associated endothelium. *International journal of cancer*, 1–11.
- CARMELIET, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*, 9 (6), 653–60.
- CHU, W.-M. (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer letters*, 328(2), 222–225.
- COURT-BROWN, W. M. & DOLL, R. (1965). Mortality from Cancer and Other causes after Radiotherapy for Ankylosing Spondylitis. *British Medical Journal*, 2, 1327-1332.
- DICHIARA, M. R., KIELY, J. M., GIMBRONE, M. A, LEE, M. E., PERRELLA, M. A., TOPPER, J. N. (2000). Inhibition of E-selectin gene expression by transforming growth factor beta in endothelial cells involves coactivator integration of Smad and nuclear factor kappaB-mediated signals. *The Journal of experimental medicine*, 192(5), 695–704.
- DIMRI, G. P., LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., MEDRANO, E. E., LINSKENS M., RUBELJ, I., PEREIRA-SMITH O., PEACOCKE M., CAMPSI J. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9363–9367.

- EDWARDS, E., GENG, L., TAN, J., ONISHKO, H., DONNELLY, E., & HALLAHAN, D. E. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation. *Cancer Research*, 62(16), 4671–4677.
- FERRARA, N., & DAVIS-SMYTH, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews*, 18(1), 4–25.
- ERMAKOV, A. V, KONKOVA, M. S., KOSTYUK, S. V, SMIRNOVA, T. D., MALINOVSKAYA, E. M., EFREMOVA, L. V, & VEIKO, N. N. (2011). An extracellular DNA mediated bystander effect produced from low dose irradiated endothelial cells. *Mutation research*, 712 (1-2), 1–10.
- FRESHNEY R. I. (2010a): Serum-Free Media In: *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6. Auflage, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 115-132.
- FRESHNEY R. I. (2010b): Subculture and Cell Lines In: *A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6. Auflage, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 187-206.
- FRESHNEY R. I. (2010c): Quantitation In: *A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6. Auflage, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 335-364.
- FURLONG, H., MOTHERSILL, C., LYNG, F. M., & HOWE, O. (2013). Apoptosis is signalled early by low doses of ionising radiation in a radiation-induced bystander effect. *Mutation research*, 741-742, 35–43.
- GARLANDA, C., PARRAVICINI, C., SIRONI, M., DE ROSSI, M., WAINSTOK DE CALMANOVICI, R., CAROZZI, F., BUSSOLINO, F., COLOTTA F., MANTOVANI A., VECCHI A. (1994). Progressive growth in immunodeficient mice and host cell recruitment by mouse endothelial cells transformed by polyoma middle-sized T antigen: implications for the pathogenesis of opportunistic vascular tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(15), 7291–7295.
- GENG, L., CHAUDHURI, A., TALMON, G., WISECARVER, J. L., & WANG, J. (2013). TGF-Beta Suppresses VEGFA-Mediated Angiogenesis in Colon Cancer Metastasis. *PloS one*, 8(3).
- GRELL, M., ZIMMERMANN, G., GOTTFRIED, E., CHEN, C. M., GRÜNWARD, U., HUANG, D. C., WU LEE, Y. H., DÜRKOP, H., ENGELMANN, H., SCHEURICH, P., WAJANT, H., STRASSER, H., (1999). Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *The EMBO journal*, 18(11), 3034–3043.
- HABRAKEN, Y., & PIETTE, J. (2006). NF-kappaB activation by double-strand breaks. *Biochemical pharmacology*, 72(9), 1132–41.
- HAYASHI, T., KUSUNOKI, Y., HAKODA, M., MORISHITA, Y., KUBO, Y., MAKI, M., KASAGI, F., KODAMA K., MACPHEE D. G., KYOIZUMI S. (2003). Radiation dose-dependent increases in inflammatory response markers in A-bomb survivors. *International Journal of Radiation Biology*, 79(2), 129–136.

- HEI, T., K., ZHOU, H., CHAI, Y., PONNAIYA, B., & N. IVANOV, V. (2011). Radiation Induced Non-targeted Response: Mechanism and Potential Clinical Implications. *Current Molecular Pharmacology*, 4(2), 96–105.
- HERBST H., NIEDOBITEK G., MÜLLER CH. (2008): ENTZÜNDUNG. IN: BÖCKER W. (Hrsg.), Denk H. (Hrsg.), Heitz Ph. U. (Hrsg.), Moch H. (Hrsg.) Pathologie. 4. Auflage Urban & Fischer/Elsevier GmbH, 117-146.
- HILDEBRANDT, G., SEED, M. P., FREEMANTLE, C. N., ALAM, C. A, COLVILLE-NASH, P. R., TROTT, K. R. (1998). Mechanisms of the anti-inflammatory activity of low-dose radiation therapy. *International journal of radiation biology*, 74(3), 367–378.
- HILDEBRANDT, G., LOPPNOW, G., JAHNS, J., HINDEMITH, M., ANDEREGG, U., SAALBACH, A., & KAMPRAD, F. (2003). Inhibition of the iNOS pathway in inflammatory macrophages by low-dose X-irradiation in vitro. Is there a time dependence? *Strahlentherapie und Onkologie*, 179(3), 158–66.
- HILDEBRANDT, G., MAGGIORELLA, L., RÖDEL F., F., RÖDEL V., (2002). Mononuclear cell adhesion and cell adhesion molecule liberation after X-irradiation of activated endothelial cells in vitro, 78(4) 315-325.
- HILDEBRANDT, G., RADLINGMAYR, A., ROSENTHAL, S., ROTHE, R., JAHNS, J., HINDEMITH, M., RÖDEL, F., KAMPRAD, F. (2003). Low-dose radiotherapy (LD-RT) and the modulation of iNOS expression in adjuvant-induced arthritis in rats. *International journal of radiation biology*, 79(12), 993–1001.
- HILDEBRANDT, G. (2010). Non-cancer diseases and non-targeted effects. *Mutation research*, 687(1-2), 73–77.
- JEON, H., & BOO, Y. C. (2013). Senescent endothelial cells are prone to TNF- α -induced cell death due to expression of FAS receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 438(2), 277–282.
- IGARASHI, K., SAKIMOTO, I., KATAOKA, K., OHTA, K., & MIURA, M. (2007). Radiation-induced senescence-like phenotype in proliferating and plateau-phase vascular endothelial cells. *Experimental Cell Research*, 313(15), 3326–3336.
- JANEWAY C.A., TRAVERS P., WALPORT M., SCHLOMCHIK M. (2002): Die angeborene Immunität. In: Immunologie. 5. Auflage, Spektrum, Heidelberg-Berlin, 37-82.
- KADHIM, M., SALOMAA, S., WRIGHT, E., HILDEBRANDT, G., BELYAKOV, O. V, PRISE, K. M., & LITTLE, M. P. Non-targeted effects of ionising radiation-Implications for low dose risk. *Mutation research*, 752(2), 84–98.
- KERN, P., KEILHOLZ, L., FORSTER, C., SEEGENSCHMIEDT, M. H., SAUER, R., HERRMANN, M. (1999). In vitro apoptosis in peripheral blood mononuclear cells induced by low-dose radiotherapy displays a discontinuous dose-dependence. *International journal of radiation biology*, 75(8), 995–1003.

- KERN, P. M., KEILHOLZ, L., FORSTER, C., STACH, C., BEYER, T. D., GAJPL, U. S., KALDEN, J. R., HALLMANN R., HERRMANN M. (2000). UVB-irradiated T-cells undergoing apoptosis lose L-selectin by metalloprotease-mediated shedding. *International journal of radiation biology*, 76(9), 1265–71.
- KOSTYUK, S. V, ERMAKOV, A. V., ALEKSEEVA, A. Y., SMIRNOVA, T. D., GLEBOVA, K. V, EFREMOVA, L. V, BARANOVA, A., VEIKO, N. N. (2012). Role of extracellular DNA oxidative modification in radiation induced bystander effects in human endotheliocytes. *Mutation research*, 729(1-2), 52–60.
- KUMAR, S., SINGH, B. K., PANDEY, A. K., KUMAR, A., SHARMA, S. K., RAJ, H. G., PRASAD, A. K., VAN DER EYCKEN, E., PARMAR, V. S., GHOSH B., (2007). A chromone analog inhibits TNF- α induced expression of cell adhesion molecules on human endothelial cells via blocking NF-kappaB activation. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(8), 2952–2962.
- KUSUNOKI, Y., KODAMA, Y., HIRAI, Y., KYOIZUMI, S., NAKAMURA, N., & AKIYAMA, M. (1995). Cytogenetic and immunologic identification of clonal expansion of stem cells into T and B lymphocytes in one Atomic-bomb survivor. *Blood*, 86(6), 2106–2112.
- LANGLEY, R. E., BUMP, E. A, QUARTUCCIO, S. G., MEDEIROS, D., & BRAUNHUT, S. J. (1997). Radiation-induced apoptosis in microvascular endothelial cells. *British Journal of Cancer*, 75(5), 666–672.
- LARBOURET, C., ROBERT, B., LINARD, C., TEULON, I., GOURGOU, S., BIBEAU, F., MARTINEAU, P., SANTORO L., POUGET J.-P., PELEGRIN A., AZRIA D. (2007). Radiocurability by targeting tumor necrosis factor- α using a bispecific antibody in carcinoembryonic antigen transgenic mice. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 69(4), 1231–1237.
- LEBRIN, F., DECKERS, M., BERTOLINO, P., & TEN DIJKE, P. (2005). TGF- β receptor function in the endothelium. *Cardiovascular research*, 65(3), 599–608.
- LI, M. O., WAN, Y. Y., SANJABI, S., ROBERTSON, A.-K. L., & FLAVELL, R. A. (2006). Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annual review of immunology*, 24, 99–146.
- LING, C. C., GERWECK, L. E., ZAIDER, M., & YORKE, E. (2010). Dose-rate effects in external beam radiotherapy redux. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 95(3), 261–268.
- LÖDERMANN, B., WUNDERLICH, R., FREY, S., SCHORN, C., STANGL, S., RÖDEL, F., KEILHOLZ, L., FIETKAU, R., GAJPL, U.S., AND FREY, B. (2012). Lowdose ionizing radiation leads to a NF-kappaB dependent decreased secretion of active IL-1 β by activated macrophages with a discontinuous dose-dependency. *International journal of radiation biology*, 88(10), 727–734.
- MADAN, B., PRASAD, A. K., PARMAR, V. S., GHOSH, B. (2004). 1,4-dihydroxyxanthone modulates the adhesive property of endothelial cells by inhibiting intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and E-selectin. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(6), 1431–1437.

- MANDA, K., GLASOW, A., PAAPE, D., HILDEBRANDT, G. (2012). Effects of ionizing radiation on the immune system with special emphasis on the interaction of dendritic and T cells. *Frontiers in oncology*, 2:102.
- MASLI, S., & TURPIE, B. (2009). Anti-inflammatory effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha are mediated via TNF-R2 (p75) in tolerogenic transforming growth factor-beta-treated antigen-presenting cells. *Immunology*, 127(1), 62–72.
- MCDONALD, P. P., FADOK, V. A., BRATTON, D., & HENSON, P. M. (1999). Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(11), 6164–6172.
- MICHEAU, O., & TSCHOPP, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114(2), 181–190.
- MINAMINO, T., MIYAUCHI, H., YOSHIDA, T., TATENO, K., KUNIEDA, T., & KOMURO, I. (2004). Vascular cell senescence and vascular aging. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 36(2), 175–183.
- NIEWALD, M., SEEGENSCHMIEDT, M. H., MICKE, O., GRAEBER, S., MUECKE, R., SCHAEFER, V., SCHEID, C., FLECKSTEIN, J., LICHT, N., RUEBE C. (2012). Randomized, multicenter trial on the effect of radiation therapy on plantar fasciitis (painful heel spur) comparing a standard dose with a very low dose: mature results after 12 months' follow-up. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 84(4), e455–62.
- OH, C. W., BUMP, E. A., KIM, J. S., JANIGRO, D., MAYBERG, M. R. (2001). Induction of a senescence-like phenotype in bovine aortic endothelial cells by ionizing radiation. *Radiation Research*, 156(3), 232–240.
- PARK, M.-T., OH, E.-T., SONG, M.-J., KIM, W.-J., CHO, Y. U., KIM, S. J., HAN, J.-Y., SUH, J.-K., CHOI, E. K., LIM, U. L., SONG, C. W. PARK, H. J. (2012a). The radiosensitivity of endothelial cells isolated from human breast cancer and normal tissue in vitro. *Microvascular research*, 84(2), 140–148.
- Park, M.-T., Oh, E.-T., Song, M.-J., Lee, H., & Park, H. J. (2012b). Radio-sensitivities and angiogenic signaling pathways of irradiated normal endothelial cells derived from diverse human organs. *Journal of radiation research*, 53(4), 570–580.
- PHILLIPS, A., TOPLEY, N., STEADMAN, R., MRRIEY, K., & WILLIAMS, J. D. (1996). Induction of TGF-β1 synthesis in D-glucose primed human proximal tubular cells by IL-113 and TNFα. *Kidney International*, 50, 1546–1554.
- PLUDER, F., BARJAKTAROVIC, Z., AZIMZADEH, O., MÖRTL, S., KRÄMER, A., STEININGER, S., SARIOGLU, H., LESZCZYNSKI, D., NYLUND R., HAKANEN A., SRIHARSHAN A., ATKINSON, M. J., TAPIO S. (2011). Low-dose irradiation causes rapid alterations to the proteome of the human endothelial cell line EA.hy926. *Radiation and Environmental Biophysics*, 50(1), 155–166.

- POBER, J. S., & COTRAN, R. S. (1990) The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation*, 50(4), 537-544.
- POBER, J. S., & SESSA, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 7(10), 803–815.
- RIQUIER, H., WERA, A.-C., HEUSKIN, A.-C., FERON, O., LUCAS, S., & MICHIELS, C. (2013). Comparison of X-ray and alpha particle effects on a human cancer and endothelial cells: Survival curves and gene expression profiles. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 106(3), 397–403.
- RÖDEL, F., KLEY, N., BEUSCHER, H. U., HILDEBRANDT, G., KEILHOLZ, L., KERN, P., VOLL, R., HERRMANN, M., SAUER, R. (2002). Anti-inflammatory effect of low-dose X-irradiation and the involvement of a TGF- β_1 -induced down-regulation of leukocyte / endothelial cell adhesion. *Int. J. Radiat. Biol* 78(8), 711-719.
- RÖDEL, F., SCHALLER, U., SCHULTZE-MOSGAU, S., BEUSCHER, H.-U., KEILHOLZ, L., HERRMANN, M., VOLL, R., SAUER R., HILDEBRANDT G. (2004). The induction of TGF-beta1 and NF-kappaB parallels a biphasic time course of leukocyte/endothelial cell adhesion following low-dose X-irradiation. *Strahlentherapie und Onkologie*, 180(4), 194–200.
- RÖDEL, F., KEILHOLZ, L., HERRMANN, M., SAUER, R., & HILDEBRANDT, G. (2007). Radiobiological mechanisms in inflammatory diseases of low-dose radiation therapy. *International journal of r*
- RÖDEL, F., HOFMANN, D., AUER, J., KEILHOLZ, L., RÖLLINGHOFF, M., SAUER, R., BEUSCHER, H. U. (2008). The anti-inflammatory effect of low-dose radiation therapy involves a diminished CCL20 chemokine expression and granulocyte/endothelial cell adhesion. *Strahlentherapie und Onkologie*, 184(1), 41–7. *adiation biology*, 83(6), 357–366.
- RÖDEL, F., FREY, B., CAPALBO, G., GAIPL, U., KEILHOLZ, L., VOLL, R., HILDEBRANDT, G., RÖDEL, C. (2010). Discontinuous induction of X-linked inhibitor of apoptosis in EA.hy.926 endothelial cells is linked to NF- κ B activation and mediates the anti-inflammatory properties of low-dose ionising-radiation. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 97(2), 346–351.
- RÖDEL, F., FREY, B., MANDA, K., HILDEBRANDT, G., HEHLGANS, S., KEILHOLZ, L., SEEGENSCHMIEDT, MH., GAIPL US., RÖDEL C. (2012a). Immunomodulatory properties and molecular effects in inflammatory diseases of low-dose x-irradiation. *Frontiers in oncology*, 2:120.
- RÖDEL, F., FREY, B., GAIPL, U., KEILHOLZ, L., FOURNIER, C., MANDA, K., SCHÖLLNBERGER, H., HILDEBRANDT, G. RÖDEL, C. (2012b). Modulation of inflammatory immune reactions by low-dose ionizing radiation: molecular mechanisms and clinical application. *Current medicinal chemistry*, 19(12), 1741–1750.
- SAUER R. (2010): Strahlenbiologie. In: Strahlentherapie und Onkologie. 5. Auflage Elsevier GmbH, München, 103-127.

- SCHAUER, D., MARPLES, B., & TROTT, K. R. (2002). The effects of low-dose X-irradiation on the oxidative burst in stimulated macrophages, *78*(7), 567-576.
- SCHMIDT, S., MOSER, M., SPERANDIO, M. (2012). The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Molecular immunology*, *55*(1), 49-58.
- SCHULTZ-HECTOR, S., & TROTT, K.-R. (2007). Radiation-induced cardiovascular diseases: is the epidemiologic evidence compatible with the radiobiologic data? *International journal of radiation oncology, biology, physics*, *67*(1), 10-18.
- SEDELNIKOVA, O. A., HORIKAWA, I., ZIMONJIC, D. B., POPESCU, N. C., BONNER, W. M., & BARRETT, J. C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nature Cell Biology*, *6*(2), 168-170.
- SEEGENSCHMIEDT, MH, MICKE, O. (2012). Radiotherapy of non-malignant diseases. Past, present and future. *Strahlentherapie und Onkologie*, *188 Suppl* , 272-290.
- SEEGENSCHMIEDT, MH., MICKE, O., WILICH, N. (2004). Radiation therapy for nonmalignant diseases in Germany. Current concepts and future perspectives. *Strahlentherapie und Onkologie*, *180*(11), 718-730.
- SHAO, C., FOLKARD, M., & PRISE, K. M. (2008). Role of TGF-beta1 and nitric oxide in the bystander response of irradiated glioma cells. *Oncogene*, *27*(4), 434-440.
- SIMMS, N. A K., RAJPUT, A., SHARRATT, E. A, ONGCHIN, M., TEGGART, C. A, WANG, J., BRATTAIN, M. G. (2012). Transforming growth factor- β suppresses metastasis in a subset of human colon carcinoma cells. *BMC cancer*, *12*: 221.
- SOUCY, K. G., ATTARZADEH, D. O., RAMACHANDRAN, R., SOUCY, P. A, ROMER, L. H., SHOUKAS, A. A, BERKOWITZ, D. E. (2010). Single exposure to radiation produces early anti-angiogenic effects in mouse aorta. *Radiation and Environmental Biophysics*, *49*(3), 397-404.
- STEEL, G. G. (2001). The case against apoptosis. *Acta oncologica*, *40*(8), 968-75.
- SULLIVAN, D. E., FERRIS, M., POCIASK, D., BRODY, A. R. (2005). Tumor necrosis factor-alpha induces transforming growth factor-beta1 expression in lung fibroblasts through the extracellular signal-regulated kinase pathway. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, *32*(4), 342-349.
- THOMAS, P. A., TRACY, B. L., PING, T., WICKSTROM, M., SIDHU, N., & HIEBERT, L. (2003). Relative biological effectiveness (RBE) of 210 Po alpha-particles versus X-rays on lethality in bovine endothelial cells. *International Journal of Radiation Biology*, *79*(2), 107-118.
- TOMONAGA, M. (1962). Leukaemia in Nagasaki atomic bomb survivors from 1945 through 1959. *Bulletin of the World Health Organization*, *26*, 619-631.
- TROTT, K.-R., & KAMPRAD, F. (2006). Estimation of cancer risks from radiotherapy of benign diseases. *Strahlentherapie und Onkologie*, *182*(8), 431-436.

- TSUKIMOTO, M., HOMMA, T., MUTOU, Y., KOJIMA, S. (2009). 0.5 Gy Gamma Radiation Suppresses Production of TNF- α through Up-regulation of MKP-1 in Mouse Macrophage RAW264.7 Cells, *171*(2), 219–224.
- VALA, I. S., MARTINS, L. R., IMAIZUMI, N., NUNES, R. J., RINO, J., KUONEN, F., CARVALHO, L. M., RÜEGG, C., GRILLO I. M., BARATA J. T., MAREEL, M., SANTOS S. C. R. (2010). Low doses of ionizing radiation promote tumor growth and metastasis by enhancing angiogenesis. *PloS one*, *5*(6): e11222.
- WAJANT, H., PFIZENMAIER, K., & SCHEURICH, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation*, *10*(1), 45–65.
- WANG, L., CHEN, Q., LI, G., & KE, D. (2012). Ghrelin stimulates angiogenesis via GHSR1a-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt signal pathways in rat cardiac microvascular endothelial cells. *Peptides*, *33*(1), 92–100.
- WARSHAMANA, G. S., CORTI, M., & BRODY, A. R. (2001). TNF- α , PDGF, and TGF- β ₁ expression by primary mouse bronchiolar-alveolar epithelial and mesenchymal cells: tnf- α induces TGF- β ₁. *Experimental and molecular pathology*, *71*(1), 13–33.
- WEBER K.-J., WENZ F. (2006): Strahlenbiologische Grundlagen In: Wannenmacher Michael (Hrsg.), Debus, J., Wenz F. Strahlentherapie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 11–48.
- WILLIAMS, J., CHEN, Y., RUBIN, P., FINKELSTEIN, J., OKUNIEFF, P. (2003). The biological basis of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Seminars in radiation oncology*, *13*(3), 182–188.
- YI, J. Y., JUNG, Y.-J., CHOI, S. S., CHUNG, E. (2009). TNF- α downregulates E-cadherin and sensitizes response to γ -irradiation in Caco-2 cells. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*, *41*(3), 164–70.
- YU, J., ETO, M., AKISHITA, M., OKABE, T., OUCHI, Y. (2009). A selective estrogen receptor modulator inhibits TNF- α -induced apoptosis by activating ERK1/2 signaling pathway in vascular endothelial cells. *Vascular pharmacology*, *51*(1), 21–28.
- ZHANG, R., XU, Y., EKMAN, N., WU, Z., WU, J., ALITALO, K., MIN, W. (2003). Etk/Bmx transactivates vascular endothelial growth factor 2 and recruits phosphatidylinositol 3-kinase to mediate the tumor necrosis factor-induced angiogenic pathway. *The Journal of biological chemistry*, *278*(51), 51267–51276.
- ZHOU, H., IVANOV, V. N., LIEN, Y.-C., DAVIDSON, M., & HEI, T. K. (2008). Mitochondrial function and nuclear factor-kappaB-mediated signaling in radiation-induced bystander effects. *Cancer research*, *68*(7), 2233–2240.

Thesen

Niedrig dosierte Bestrahlung wird seit Jahrzehnten erfolgreich zur Therapie benigner Erkrankungen eingesetzt. Diese günstige Wirkung wird durch unterschiedliche antiinflammatorische Mechanismen vermittelt, in denen Endothelzellen neben anderen Immunzellen eine zentrale Rolle spielen.

In verschiedenen *In-vitro*-Untersuchungen wurde der Einfluss niedrig dosierter Strahlung auf H5V-Endothelzellen ermittelt und mit der Wirkung hoch dosierter Bestrahlung verglichen. Dazu wurden die metabolische Aktivität, das klonogene Überleben sowie die Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins Transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) im Überstand der H5V-Zellen analysiert.

Um ein entzündliches Geschehen zu simulieren, wurden die H5V-Zellen vor der Bestrahlung mit dem proinflammatorischen Zytokin Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) stimuliert.

Die Verwendung von Serum (FBS) im Kulturmedium der H5V-Zellen führte zu einer Antagonisierung des Effektes von TNF- α auf die Endothelzellen. Da die H5V-Zellen auch mehrere Tage nach Entzug des Serums vital blieben, wurde deswegen in einem Teil der Experimente auf die Verwendung von Serum im Medium verzichtet.

Mit TNF- α stimulierte H5V-Zellen waren in ihrer metabolischen Aktivität signifikant gehemmt. Dieser Effekt war abhängig von der Konzentration und Einwirkungszeit des TNF- α . Die Verwendung von hitzeinaktiviertem Serum im Kulturmedium der Zellen hob diesen Effekt auf.

Die Stimulation mit TNF- α resultierte in einer signifikanten Zunahme der TGF- β_1 -Freisetzung der H5V-Zellen. Auch hier war die Ausprägung dieses Effektes von der Einwirkzeit des TNF- α abhängig.

Auf die Koloniebildungsfähigkeit der H5V-Zellen hatte die Stimulation mit TNF- α keinen Einfluss.

Der Einfluss der Bestrahlung auf die metabolische Aktivität der H5V-Zellen war gering. Während es nach höheren Bestrahlungsdosen zu einer Abnahme der metabolischen Aktivität kam, zeigten sich bei niedrigen Dosen ($\leq 0,25$ Gy) tendenziell geringfügige Zunahmen der metabolischen Aktivität.

Koloniebildungstests im Hochdosisbereich mit dem Linearbeschleuniger ergaben für die H5V-Zellen eine für Endothelzellen typische Überlebenskurve. Bei fraktionierter Bestrahlung am Röntgentherapiegerät ergaben sich in den Überlebenskurven Erholungs-Schultern im Dosisbereich bis 2 Gy. Niedrige Bestrahlungsdosen $< 0,125$ Gy am Röntgentherapiegerät führten sowohl bei Einzeldosen als auch bei fraktionierter Bestrahlung tendenziell zu einer geringfügig gesteigerten Koloniebildungsfähigkeit der Endothelzellen.

Die Bestrahlung wirkte sich nur geringfügig und eher hemmend auf die TGF- β_1 -Freisetzung der H5V-Zellen aus.